

EP 03 / 13709



BEST AVAILABLE COPY

REC'D	22 JAN 2004
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 56 669.0
Anmeldetag: 04. Dezember 2002
Anmelder/Inhaber: Universitätsklinikum Charité an der
Humboldt-Universität zu Berlin,
Berlin/DE
Bezeichnung: Gemisch mindestens zweier Fusionsproteine
sowie ihre Herstellung und Verwendung
IPC: C 12 Q 1/02

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 09. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)
Hoß

Gemisch mindestens zweier Fusionsproteine sowie ihre Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Proteingemisch, enthaltend mindestens ein erstes Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in ein Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, und mindestens ein zweites Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

Die Phagendisplay-Technologie wird heutzutage in vielen Bereichen der Biotechnologie zum Auffinden von Proteinen mit gewünschten Bindungseigenschaften und enzymatischen Aktivitäten verwendet (Forrer, P. et al. (1999) Current Opinion in Struct. Biol. 9:514-520 und Gao, C. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:12612-12616). Gleichermassen wird die Technologie verwendet, um beispielsweise die Bindungseigenschaften, die enzymatischen Eigenschaften und/oder die thermodynamische Stabilität von bereits bekannten oder durch die Phagendispplay-Technologie isolierten Proteine zu verbessern (Forrer, P. et al. (1999) siehe oben). Die Grundlage für die Phagendisplay-Technologie liegt in der Beobachtung, daß bestimmte sogenannte nicht-lytische Bakteriophagen Bakterien lediglich infizieren und die Phagenpartikel nicht etwa durch Lyse des Bakteriums freisetzen, sondern die einzelnen Bestandteile des Bakteriophagens durch das Zytosoma ins Periplasma und letztendlich auf die Bakterienzelloberfläche transportieren, wo dann der komplette Phage assembliert wird, der sich anschließend von der Bakterienzelle löst. Die Fusion eines interessierenden Proteins mit einem Phagenhüllprotein führt daher zum Export dieses Proteins aus dem bakteriellen Zytosoma und der Präsentation auf der Oberfläche des Bakteriums. Für die Präsentation geeignete Phagenhüllproteine sind beispielsweise die aus dem M13-Phagemid stammenden pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX (Gao, C. et al. (2002) siehe oben).

Der N-Terminus des Phagenhüllproteins ist nach außen gerichtet, so daß das fusionierte Protein N-terminal vom Phagenhüllprotein angeordnet sein muß, damit es auf der Phagenoberflä-

che präsentiert wird. Dies führt zu keinem Problem, wenn einzelne bereits bekannte Proteine mit einem der genannten Phagenhüllproteinen fusioniert werden sollen, da für diese Proteine START- und STOP-Codons bekannt sind. Es führt jedoch dann zu Problemen, wenn eine sogenannte Phagen-Bibliothek hergestellt werden soll, bei der die Phagenhüllproteine mit einer cDNA-Bibliothek fusioniert werden sollen. Das Problem liegt darin, daß die in cDNA-Bibliotheken enthaltenden kodierenden Nukleinsäuren in der Regel translationelle STOP-Codons am 3'-Ende enthalten da durch die Poly(A⁺)-Selektion der mRNA und durch das sich anschließende Oligo-(dT)-priming die resultierenden cDNAs immer die translationellen STOP-Codons enthalten. So liegt bei Fusion einer Oligo-(dT)-geprimten cDNA 5' vom Phagenhüllprotein immer ein STOP-Codon zwischen der cDNA und dem Phagenhüllprotein, wodurch wiederum die Expression eines Fusionsproteins aus dem cDNA kodierten Protein und dem Phagenhüllprotein verhindert wird. Daher wurde von Crameri, R. und Suter, M. (1993) Gene 137:69-75 ein neuartiges Klonierungs- und Expressionssystem entwickelt, das darauf basiert, daß die Interaktionsdomänen der beiden Oncoproteine cJun und cFos, die über ein Proteinmotiv von gleichmäßig beabstandeten Leuzinresten dem sogenannten „Leuzin-Zipper“ eine starke Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen ausbilden (Landschulz et al. (1988) Science 240:1759-64), genutzt werden, um das jeweils separat exprimierte Phagenhüllprotein und das cDNA-kodierte Protein zu einem Heterodimer zu verbinden. Dazu wurde von einem LacZ-Promotor gesteuert, ein Fusionsprotein exprimiert, das am N-Terminus aus cJun und am C-Terminus aus einem Phagenhüllprotein (pIII) bestand und ein zweites Fusionsprotein, das am N-Terminus aus cFos und am C-Terminus aus einer cDNA-Bank bestand, wobei auch dieses Protein durch einen zweiten LacZ-Promotor gesteuert wurde. Durch die Interaktion von cJun und cFos über die jeweiligen Leuzin-Zipper im Periplasma eines Bakteriums wurde dadurch die Präsentation von Protein bzw. Proteinfragmenten, die durch cDNAs kodiert sind auf filamentösen Phagen möglich.

Beim Einsatz der Phagendisplay-Technologie gibt es das weitere Problem, daß die Assemblierung der Phagen und somit auch der Einbau der Fusionsproteine in die Phagenpartikel ausschließlich im Periplasma stattfindet (Russel et al. (1997) Gene 192(1):23-32). Um die jeweiligen Fusionsproteine ins Periplasma der Bakterienzelle zu exportieren, muß demnach gegebenenfalls gentechnisch eine Sec-Signalsequenz an das Fusionsprotein angefügt werden. Diese Signalsequenz bewirkt, daß die Fusionsproteine in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand ins Periplasma transportiert werden. Eine beträchtliche Anzahl von Proteinen kann jedoch nicht mittels des Sec-Transportwegs ins Periplasma gelangen, da sogenannte „Stop-

Transfer“-Sequenzen oder eine zu schnelle Faltung des Proteins, die bereits ins Zytoplasma erfolgt, einen Transport verhindern. „Stop-Transfer“-Sequenzen bewirken durch eine lokale Häufung positiv-geladener Aminosäuren in der Proteinsequenz, daß das entsprechende Protein bei der Translokation über den Sec-Transportweg in der inneren Membran stecken bleibt.

- 5 Proteine, die durch ihre schnelle und/oder stabile Faltung nicht mehr in der entfalteten Form von den Proteinen des Sec-Transportweges – insbesondere von SecB – gebunden werden können, werden nicht zum Sec-Tranlokase-Komplex transportiert und verbleiben im Cytoplasma (Yamane et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:19690-19696 und Berks, B. C. (1996) Mol. Microbiol. 22:393-404 und Bergs, B. C. et al. (2000) Mol. Microbiol. 35:260-274). Proteine, 10 die auf reduzierende Bedingungen oder die für ihre Funktionsfähigkeit auf zytoplasmatische Co-Faktoren, wie beispielsweise FeS-Zentren oder Molybdopterin angewiesen sind, können ebenfalls nicht über den Sec-Transportweg in funktioneller Form ins Periplasma gelangen. Aufgrund der Inkompatibilität mit dem Sec-Transportweg können demnach viele Polypeptide nicht funktionell gefaltet mit dem Phagendisplay präsentiert und anschließend selektiert werden. 15 Die Translokation der Fusionsproteine über den Sec-Transportweg ins Periplasma stellt daher einen wesentlichen Nachteil der im Stand der Technik bekannten Phagendisplay-Techniken dar.

Aus den unterschiedlichen Anforderung an das zelluläre Milieu bei Faltung bestimmter Proteine ergibt sich ein weiteres Problem bei der Expression von Fusionsproteinen insbesondere in Bakterien, wenn der eine Teil des Fusionsproteins nur im Periplasma eine korrekte Faltung annimmt, wie das z.B. bei Antikörperproteinen der Fall ist (Gao, C. et al. (2002) siehe oben) und der andere Teil des Fusionsproteins nur im Zytoplasma korrekt gefaltet werden kann, wie 20 das z.B. beim grün-floreszierenden Protein (GFP) der Fall ist, das Sec-inkompatibel ist. So ist

25 z.B. die Expression von Antikörper-GFP-Fusionsprotein, d.h. von Fluoreszenz-markierten Antikörpermolekülen, in Bakterien bisher nicht möglich. Die Beschränkung auf den Sec-Transportweg verhindert somit die Herstellung einer Vielzahl interessanter Proteinkonjugate insbesondere in Bakterien.

30 Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin die Einschränkung der im Stand der Technik bekannten Phagendisplay-Technologie auszuräumen und die Herstellung von Fusionsproteinen zu ermöglichen, die bei Herstellung durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren nicht zu funktionellen Fusionsproteinen führen.

Die vorliegende Erfindung stellt daher in einem Aspekt ein Proteingemisch zur Verfügung, enthaltend: a) mindestens ein erstes Fusionsprotein, enthaltend: i) ein Protein oder Proteinfragment, ii) eine Interaktionsdomäne und iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, und b) mindestens ein zweites Fusionsprotein, enthaltend: i) ein Protein oder Proteinfragment, ii) eine Interaktionsdomäne und iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

Das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins umfaßt vorzugsweise Proteine, die im ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran eines Bakteriums, vorzugsweise eines Gram-negativen Bakteriums transloziert werden können und die demnach nicht für ihre korrekte Faltung auf das reduzierende zytoplasmatische Milieu und/oder auf zytoplasmatische Co-Faktoren angewiesen sind und die auch im Periplasma eine im wesentlichen korrekte Faltung erreichen können. Beispiele solcher Proteine umfassen, sind aber nicht limitiert auf schwere Immunoglobulinketten, leichte Immunoglobulinketten, Fragmente dieser Ketten, sogenannte „Single-Chain-Antikörper“ (Bird, R. E. (1988) Science 242:423-6), Diabodies (Holliger, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90(14):6444-8, Rezeptoren, vorzugsweise extrazelluläre Domänen von Rezeptoren, wie beispielsweise, EGFR, PDGFR oder VEGFR, oder Rezeptorliganden, wie beispielsweise EGF, PDGF oder VEGF, Integrine, vorzugsweise deren extrazelluläre Domänen, Intimine und deren Domänen, wie beispielsweise EaeA, Kohlenhydrat-bindende Proteine und Domänen davon, wie MBP und CBD, Albumin-bindende Proteine und Domänen oder Protein A und dessen Domänen.

Das Protein oder Proteinfragment des zweiten Fusionsproteins kann ein beliebiges Protein oder Proteinfragment sein, bevorzugt sind jedoch Proteinfragmente, die ihre Faltung und/oder ihre Funktion nur dann erhalten, wenn sie sich bereits im Zytoplasma eines Bakteriums falten und daher in einen im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran in das Periplasma transloziert werden. Beispiele solcher Proteine sind autofluoreszierende Proteine, wie beispielsweise GFP oder Varianten davon mit veränderten Absorptionsmaxima, Enzyme, wie beispielsweise β -Lactamase, Cofaktor-abhängige Proteine, wie beispielsweise

TMAO-Reduktase und Meerrettich-Peroxidase, Proteine, die von einer cDNA kodiert werden, welche aus einer cDNA-Bibliothek stammt, oder synthetische Proteine.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins und die Proteintranslokationssequenz ein Phagenhüllprotein oder ein periplasmatisches Markerenzym, wie PhoA, ein Intimin ein Protein der äußeren Bakterienmembran oder ein periplasmatisches Rezeptorprotein, insbesondere ein Kohlenhydrat-bindendes Protein. Bevorzugte Phagenhüllproteine, die in einem Proteingemisch der vorliegenden Erfindung enthalten sein können, sind ausgewählt aus den M13-Phagemid Hüllproteinen pIII, pVI, pVII, 10 pVIII und pIX. Von diesen Phagenhüllproteinen sind jedoch nur pIII und pVIII mit einer bekannten Sec-abhängigen Proteintranslokationssequenz versehen, wobei die in den restlichen Phagenhüllproteinen enthaltenden Proteintranslokationssequenzen noch nicht identifiziert worden sind. Da diese Phagenhüllprotein dennoch in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand in das Periplasma des Bakteriums transportiert werden, werden solche Proteine im 15 Sinn der Erfindung auch ohne Identifikation der Proteintranslokationssequenz als Proteine angesehen, die aus einem Protein oder Proteinfragment und einer Proteintranslokationssequenzen bestehen.

Die Interaktionsdomänen, die in dem ersten und zweiten Fusionsprotein verwendet werden, 20 führen zur Bindung des ersten Fusionsproteins an das zweite Fusionsprotein. Bevorzugt sind hierbei Interaktionsdomänen, die zu einer relativ festen Interaktion der beiden Proteine führen, wobei eine relativ feste Interaktion eine Interaktion ist, die auch im oxidativen Milieu des Periplasmas, auf der Bakterienzelloberfläche oder bei der Sezernierung des Heterodimers 25 oder Heteromultimers auch außerhalb der Zelle bestehen bleibt. Geeignete Interaktionsdomänen des ersten und zweiten Fusionsproteins, die erfindungsgemäß in den Fusionsproteinen enthalten sein können, sind beispielsweise eine Leuzin-Zipper-Domäne und eine Leuzin-Zipper-Domäne, wie sie zuerst in den zwei Oncoproteinen cJun und cFos beschrieben wurden (Landschulz et al. (1988) siehe oben) Varianten davon aus anderen Hetero- oder Homodimeren sowie artificielle Leuzin-Zipper-Domänen oder eine Helix-Loop-Helix-Domäne und eine 30 Helix-Loop-Helix-Domäne (Moor et al. (1989) Cell 56:777-783), ein Calmodulin und ein Calmodulin-bindendes Peptid (Montigiani, S. et al. (1996) JMB 258:6-13) oder jeweils ein Peptid eines Peptid-Dimers. Der Begriff Interaktionsdomänen umfaßt auch Domänen die eine Multimerisierung von mehr als zwei Fusionsproteinen erlauben.

Die Proteintranslokationssequenz des ersten Fusionsproteins bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium, vorzugsweise in einem Gram-negativen Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran in das Periplasma transloziert wird. Der Fachmann ist ohne weiteres in der Lage, entsprechende Proteintranslokationssequenzen aufzufinden, wobei er sich des folgenden Experiments bedienen kann. Eine potentielle als Proteintranslokationssequenz geeignete Proteinsequenz, die zur Translokation eines damit fusionierten Proteins in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand führt, wird mit einem ein GFP-myc-TAG enthaltenden Protein fusioniert. Wenn die potentielle Proteintranslokationssequenz nicht zur Proteintranslokation ins Periplasma führt, wird das GFP-Protein im Zytoplasma des Bakteriums gebildet, was sich über die zytoplasmatische Fluoreszenz nachweisen läßt, es gelangt dann jedoch nicht an die Oberfläche oder ins Medium, so daß der Myc-TAG durch einen anti-Myc-Antikörper bspw. den monoklonalen Antikörper 9E10 weder im Medium noch auf der Oberfläche nachweisbar ist. Führt die Sequenz jedoch zur Translokation des Fusionsproteins ins Periplasma und schließlich zur Präsentation auf der Oberfläche bzw. zur Sezernierung in die Umgebung des Bakteriums, so läßt sich das präsentierte bzw. sezernierte GFP-myc-TAG-Fusionsprotein durch einen Anti-myc-Antikörper im Medium und/oder auf der Oberfläche des Bakteriums nachweisen. Gleichzeitig sollte im Periplasma in diesem Fall keine Fluoreszenz beobachtet werden können, da bei Translokation des GFPs ins Periplasma in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand sich das Protein dort nicht mehr korrekt faltet (sogenannte „Sec-Inkompatibilität“). Die Proteintranslokationssequenzen die bevorzugt im ersten Fusionsprotein verwendet werden sind solche, die in dem Sec-abhängigen Transportweg (Danese, P. N. und Silhavy, T. J. (1998) Annu. Rev. Genet. 32:59-94), die in dem SRP-abhängigen Transportweg (Meyer, D. I. et al. 1982) Nature 297:647-650) oder die in einem YidC-abhängigen Transportweg erkannt werden (Samuelson, J. C. et al. (2000) Nature 406:637-641). Allerdings kann es sich auch um eine Transportweg-unabhängige Sequenz handeln. Besonders geeignete Proteintranslokationssequenzen sind daher beispielsweise Signalsequenzen des PhoA, PelB, OmpA und pIII.

Als weiterer Bestandteil enthält das zweite Fusionsprotein eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium, vorzugsweise in einem Gram-negativen Bakterium, in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird. Eine Proteintranslokationssequenz mit dieser Eigenschaft liegt dann vor, wenn ein Protein, beispielsweise GFP, das nur im Zytoplasma des Bakteriums seine funktionelle Konformation einnehmen kann, ohne Verlust der Autofluores-

zenz ins Periplasma transportiert wird. Diese Eigenschaft der erfindungsgemäßen Proteintranslokationssequenz lässt sich mit dem vorangehend im Hinblick auf die erste Proteintranslokationssequenz beschriebenen Experiment, untersuchen. Mit einem ähnlichen Experiment wurde bereits ein Konsensusmotiv für das Tat-spezifische Führungspeptid des Twin-
5 Arginine-Translokation-(Tat)-Transportwegs von Bakterien und Pflanzenchloroplasten ermittelt. Der im Stand der Technik bekannte Tat-Transportweg erlaubt den Transport von bereits im Zytoplasma gefalteten Proteinen ins Periplasma und kann somit Proteine, die mit dem Sec-Transportweg inkompatibel sind, ins Periplasma transportieren. Genau wie der Transport über den Sec-Transportweg, wird auch der Tat-Transportweg durch eine spezielle Gruppe von
10 Führungssequenzen vermittelt (DeLisa, M. P. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:29825-29831). Ein weiterer im Stand der Technik bekannter Transportweg, der den Transport von Proteinen in im wesentlichen gefalteten Zustand erlaubt, ist der über Thylakoid-Membranen (Settles, A.
15 M. und Martienssen, R. (1998) Transcell Biol. 8:494-501). Daher enthält das zweite Fusionsprotein in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Signalsequenz, die von einem Tat-abhängigen Transportweg oder von einem Thylakoid-Δph-abhängigen Transportweg erkannt wird und dadurch zur Translokation des Fusionsproteins in im wesentlichen gefalteten Zustand führt. Ein Konsensusmotiv einer Proteintranslokationssequenz, das von einem Tat-abhängigen Transportweg erkannt wird, ist in DeLisa, M. P. et al.
20 ((2002) siehe oben) beschrieben worden. Die Sequenz lautet: S/T/RRXFLK.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Proteingemisches sind mindestens ein erstes und mindestens ein zweites Fusionsprotein aneinander kovalent oder nicht-kovalent gebunden. Zur Erreichung einer kovalenten Bindung der zwei getrennt exprimierten Fusionsproteine können beispielsweise in dem Protein zusätzlich nahe der Interaktionsdomäne Cysteinreste oder Homologe davon angeordnet werden, die im oxidativen Milieu des Periplasmas eine kovalente Bindung zwischen den beiden Fusionsproteinen herstellen. Eine kovalente Bindung kann jedoch beispielsweise auch durch die Inkorporation von Aminosäuren mit Foto-aktivierbaren Gruppen in die beiden Fusionsproteine und anschließende UV-Exposition der zunächst lediglich nicht-kovalent aneinander gebundenen Protein erreicht
25 werden. Dem Fachmann sind weitere Verfahren bekannt, um zwei zunächst allein durch nicht-kovalente Bindung verbundene Proteine miteinander zu verbinden. Zu diesem dem Fachmann bekannten Verfahren der kovalenten Verbindung zweier nicht-kovalent-gebundener Fusionsproteine zählt beispielsweise das Psoralen-Crosslinking.
30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäuregemisch, das für ein erfindungsgemäßes Proteingemisch kodiert. Eine kodierende Nukleinsäure, im Sinne der Erfindung ist ein Nukleinsäuresequenz, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Vorläufer davon kodiert. Bevorzugterweise handelt es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um

5 DNA oder RNA, vorzugsweise um eine DNA, wobei die DNA einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen kann. Die jeweils für das erste oder zweite Fusionsprotein kodierende Nukleinsäure enthält des weiteren Promotoren, die die Expression des jeweiligen Fusionsproteins in der Wirtszelle ermöglichen. Geeignete Promotoren für die Expression in beispielsweise *E. coli* sind der trp-Promotor, lacZ-Promotor, tet-Promotor, T7-Promotor oder ara-

10 Promotor. Weitere Elemente, die in den jeweiligen, das Nukleinsäuregemisch ausmachenden Nukleinsäuren vorhanden sein können, sind Replikationsursprünge (Ori), selektive Markergene, die beispielsweise Ampizillin- oder Chloramphenikolresistenz vermitteln. Die Nukleinsäuren können neben dem für das jeweilige Fusionsprotein kodierenden Bereich, die üblicherweise in bakteriellen Expressionsvektoren verwendeten Elemente aufweisen. Dem Fachmann

15 sind eine Vielzahl solcher Elemente sowie Vektoren bekannt, wie beispielsweise pGEM oder pUC.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Nukleinsäuregemisches der vorliegenden Erfindung, sind die zwei Nukleinsäuren, die für das erste und zweite Fusionsprotein kodieren, kovalent miteinander verbunden, vorzugsweise über Phosphordiester-Bindungen. Insbesondere sind die Nukleinsäuremoleküle, die für das erste und zweite Fusionsprotein kodieren und geeignete regulatorische Elemente enthalten, auf einem Plasmid enthalten, so daß die erfindungsgemäßes Proteingemische bereits durch Transfektion nur eines Plasmids bzw. wenn diese Nukleinsäure in einem Phagen enthalten ist, durch Infektion mit nur einem Phagen beispielweise in einem Bakterium hergestellt werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform werden beide Fusionsprotein unter der Kontrolle nur eines Promotors als biciströnische Kassette exprimiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes Proteingemisch und/oder enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuregemisch. Ein Vektor, im Sinne der vorliegenden Erfindung, ist ein Protein-Nukleinsäuregemisch, das in der Lage ist, die in ihm enthaltenen Proteingemische und/oder Nukleinsäuregemisch in eine Zelle einzuführen. Dabei ist es bevorzugt, daß dabei die von den Nukleinsäuregemischen kodierten Fusionsproteine in der Zelle zur Expression kommen und

somit *de novo* synthetisierte Fusionsproteine aus der Zelle gewonnen, bzw. auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Geeignete Vektoren sind beispielsweise nicht-lytische Phagen, wie M13-Phage, fd-Phage, F1-Phage und lytische Phagen, wie λ -Phage.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ist eine Zelle, enthaltend ein erfindungsgemäßes Proteingemisch, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuregemisch und/oder einen erfindungsgemäßem Vektor. Erfindungsgemäße Zellen können prokaryontische oder eukaryontische Zellen sein. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Zellen um prokaryontische Zellen, insbesondere
10 um Bakterien und noch bevorzugter um *E. coli* (TG1, XL-1, JM83, BL21) oder *B. subtilis*.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Bibliothek, enthaltend mindestens zwei erfindungsgemäße Proteingemische, mindestens zwei erfindungsgemäße Vektoren und/oder mindestens zwei erfindungsgemäße Zellen, wobei die Proteine oder Proteinfragmente der jeweiligen ersten oder jeweiligen zweiten Fusionsproteine voneinander unterschiedlich sind. Eine solche Bibliothek kann entweder gezielt ausgewählte unterschiedliche bekannte Proteine oder Proteinfragmente enthalten oder die Interaktionsdomäne und die Proteintranslokationssequenz des ersten oder zweiten bevorzugt des zweiten Fusionsproteins können mit einer cDNA-Bibliothek fusioniert werden, wobei bei Expression dieser Nukleinsäuren eine
15 Vielzahl unterschiedlicher erster oder zweiter Fusionsproteine entstehen, die jeweils unterschiedliche Proteine oder Proteinfragmente enthalten. Vorzugsweise wird dabei der cDNA-Anteil am C-Terminus des Fusionsproteins exprimiert, um dadurch das vorangehend geschilderte Problem bei N-terminaler Fusion einer cDNA zu umgehen. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Bibliothek eine Vielzahl von erfindungsgemäßen Zellen, wobei jede
20 Zelle ein anderes Proteingemisch herstellt, vorzugsweise auf ihrer Oberfläche präsentiert. Im Falle, daß das Protein oder Proteinfragment und die Interaktionsdomäne des ersten Proteins ein Phagenhüllprotein ist, erlaubt die erfindungsgemäße Bibliothek die Präsentation einer Vielzahl von Proteinen oder Proteinfragmenten, die im zweiten Fusionsprotein enthalten sind. Dabei ist die Präsentation nicht wie bei den im Stand der Technik bekannten Phagendisplay-
25 Bibliotheken auf Proteine oder Proteinfragmente beschränkt, die sich im Periplasma der Zelle zu ihrer funktionellen Form falten, sondern umfaßt auch Proteine, die nur im Zytoplasma ihre funktionelle Faltung erlangen können.

Die erfindungsgemäßen Proteingemische, die Heterodimere oder Multimere bilden können, wobei die Bestandteile der Heterodimere oder Multimere in mindestens zwei unterschiedlichen zellulären Kompartments ihre dreidimensionale Struktur erhalten haben, lassen sich nunmehr in einer Reihe von Verfahren unter anderem auch im Phagendisplay einsetzen.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die an ein Proteingemisch, einen erfindungsgemäßen Vektor oder an eine erfindungsgemäße Zelle binden, enthaltend die Schritte:

- a) In-Kontaktbringen mindestens einer potentiell-bindenden Substanz mit einem erfindungsgemäßen Proteingemisch, einem erfindungsgemäßen Vektor oder einer erfindungsgemäßen Zelle und
- b) Messen der Bindung der Substanz an das Proteingemisch, den Vektor und/oder die Zelle.

15 Das Verfahren dient somit vorzugsweise dem Auffinden einer Substanz oder von Substanzen, die an ein bereits bekanntes Proteintarget binden, beispielsweise um Inhibitoren, Aktivatoren, Kompetitoren oder Modulatoren des bekannten Proteintargets aufzufinden. Die potentiell bindenden Substanzen deren Bindung an ein erfindungsgemäßes Proteingemisch, einen erfindungsgemäßen Vektor und/oder eine erfindungsgemäße Zelle gemessen werden soll, kann
20 jede beliebige chemische Substanz oder jedes beliebige Substanzgemisch sein. Beispielsweise kann es sich hierbei um Substanzen einer Peptid-Bibliothek handeln, um Substanzen aus einer kombinatorischen chemischen Bibliothek, um Zellextrakte, insbesondere Pflanzenzellextrakte, und um Proteine oder Proteinfragmente.

25 Unter In-Kontaktbringen der potentiell bindenden Substanz(en) mit einem erfindungsgemäßem Proteingemisch, Vektor oder Zelle wird jede Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten verstanden, wobei sich die beiden Komponenten jeweils unabhängig voneinander in flüssiger Phase, beispielsweise in Lösung oder in einer Suspension, befinden können oder auch an eine feste Phase, beispielsweise in Form einer im wesentlichen planaren Oberfläche oder in Form von Partikeln, Perlen oder ähnlichem, gebunden sein können.
30 In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine Vielzahl unterschiedlicher potentiell bindender Substanzen an einer festen Oberfläche immobilisiert und wird mit den erfindungsgemäßem Proteingemisch, dem erfindungsgemäßem Vektor oder der erfindungsgemäßem Zelle In-Kontakt gebracht und anschließend wird die Bindung der erfindungsgemäßem Substanzen an

den verschiedenen Positionen, an denen jeweils unterschiedliche potentiell-bindende Substanzen immobilisiert sind, gemessen.

- Das Messen der Bindung des erfindungsgemäßen Proteingemisches, des Vektors oder der Zelle, an eine potentiell bindende Substanz kann beispielsweise über die Messung eines mit dem erfindungsgemäßen Proteingemisch, mit dem erfindungsgemäßen Vektor oder der erfindungsgemäßen Zelle verbundenen Markers geschehen, wobei geeignete Marker dem Fachmann bekannt sind und beispielsweise Fluoreszenz- oder radioaktive Marker umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Proteingemisch, der Vektor oder die Zelle zusätzlich im zweiten Fusionsprotein neben dem Protein oder Proteinfragment, dessen Wechselwirkung mit den potentiell-bindenden Substanzen untersucht werden soll, ein autofluoreszierendes Protein, wie beispielsweise GFP oder Varianten davon. Das Messen der Bindung der Substanz kann jedoch auch über die Änderung von elektrochemischen, insbesondere Redoxeigenschaften beispielsweise der immobilisierten potentiell bindenden Substanzen nach 15 In-Kontaktbringen gemessen werden. Geeignete Verfahren umfassen beispielsweise potentiometrische Methoden. Weitere Verfahren zum Nachweis der Bindung zweier Moleküle oder Molekülgemische, sind dem Fachmann bekannt und können gleichermaßen zum Messen der Bindung der potentiell-bindenden Substanz an das erfindungsgemäße Proteingemisch, den erfindungsgemäßen Vektor oder die erfindungsgemäße Zelle verwendet werden.

20

- Gegebenenfalls können vor, zwischen oder nach den Schritten des erfindungsgemäßen Verfahrens weitere Schritte eingeführt werden, wie beispielsweise das ein- oder mehrmalige Waschen nach dem In-Kontaktbringen, um beispielsweise unspezifische Bindungen zwischen der potentiell bindenden Substanz und dem erfindungsgemäßen Proteingemisch, dem erfindungsgemäßen Vektor oder der erfindungsgemäßen Zelle zu lösen.

- Als weitere Schritte nach dem Messen der Bindung der Substanz kann eine bindende Substanz z.B. auf Grund der gemessenen Bindungsstärke ausgewählt werden und dann direkt bspw. zur Inhibition des bekannten Proteintargets verwendet werden. Die bindende Substanz 30 kann jedoch auch durch im Stand der Technik bekannte Verfahren, die auch Verfahren der kombinatorischen Chemie umfassen modifiziert werden. Beispielsweise durch das Anfügen von Halogenseitengruppen, vorzugsweise F oder Cl, durch das Anfügen von niedrigen Alkylgruppen, wie Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, iso-Propyl-, n-Butyl-, iso-Butyl- oder tert-Butylgruppen oder durch das Anfügen von Amino-, Nitro-, Hydroxyl-, Amido- oder Carbon-

säuregruppen. Die so unterschiedlich modifizierten bindenden Substanzen können dann erneut in dem erfindungsgemäßen Verfahren auf ihre Bindung getestet werden und hinsichtlich der gewünschten Bindungsspezifität und dem dadurch erzielten Effekt (beispielsweise Aktivierung, Inhibierung oder Modulation der jeweiligen Aktivität) optimiert werden.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Auffinden von Proteinen oder Proteinfragmenten, die an eine Testsubstanz binden, enthaltend die Schritte:

- a) In-Kontaktbringen mindestens einer Testsubstanz mit einer erfindungsgemäßen Bibliothek und
- 10 b) Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren und/oder Zellen der erfindungsgemäßen Bibliothek.

Bei diesem Verfahren sollen Proteine oder Proteinfragmente ausgewählt werden, die an eine gegebene Testsubstanz binden. Vorzugsweise handelt es sich dabei um die Proteine oder Proteinfragmente des zweiten Fusionsproteins, da diese mit einer größeren Wahrscheinlichkeit korrekt gefaltet sind, als die Proteine oder Proteinfragmente des ersten Fusionsproteins, die nur dann korrekt gefaltet sind, wenn die jeweiligen Proteine auch im oxidativen Milieu des Periplasmas ihre native Konformation annehmen können. Eine Testsubstanz im Sinne der vorliegenden Erfindung kann jede beliebige chemische Substanz oder ein Gemisch davon sein. Vorzugsweise handelt es sich dabei jedoch um ein Protein oder Proteinfragment, insbesondere um einen Rezeptor, einen Rezeptorliganden, einen Transkriptionsfaktor, einen Ionenkanal, ein Molekül der Signaltransduktionskaskade, Struktur- und Speicherprotein, Toxin oder Lichtrezeptor- und Pigmentprotein. Das Messen der jeweiligen Bindung der unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren und/oder Zellen der Bibliothek an die Testsubstanz kann wie vorangehend beschrieben, über markierungsabhängige oder markierungsunabhängige Meßverfahren erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält das Verfahren die weiteren Schritte: Auswählen mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle aufgrund der gemessenen Bindung und Herstellen einer zweiten Bibliothek, wobei die Bibliothek durch Modifikation des im ausgewählten Proteingemisch, im ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltenen Proteins oder Proteinfragments erzeugt wird. Der Auswahlprozeß von Proteingemischen, Vektoren oder Zellen aus der Bibliothek wird vorzugsweise aufgrund der Stärke der Bindung durchgeführt, wobei die Protein-

gemische, Vektoren oder Zellen bevorzugt sind, die die stärkste Bindung an die jeweilige Testsubstanz zeigen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des im ausgewählten Proteingemisch, Vektor oder Zelle enthaltenen Proteins oder Proteinfragments, die durch Standardverfahren bestimmt werden kann, können Modifikation erzeugt werden, die jeweils zu geringen Änderungen der Aminosäuresequenz führen und damit zu einer Vielzahl von Derivaten, die im Vergleich zum Ausgangsprotein bzw. Proteinfragment eine leicht veränderte dreidimensionale Struktur besitzen. Solche Modifikationen lassen sich durch im Stand der Technik bekannte Verfahren beispielsweise durch Zufallsmutagenese oder auch durch gezielte Substitution einzelner Nukleinsäurecodons, die für das Protein oder Proteinfragment kodierenden Nukleinsäure, erhalten. Bevorzugt sind dabei Substitution, die sogenannte „konservative“ Substitutionen sind. Eine konservative Substitution liegt dann vor, wenn beispielsweise ein für eine basische Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon durch ein anderes für eine basische Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon, ein für eine saure Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon durch ein anderes für eine saure Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon bzw. ein für eine polare Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon durch ein anderes für eine polare Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon ersetzt wird.

Die auf Grundlage der ausgewählten Proteingemische, Vektoren oder Zellen neu erzeugten zweiten Bibliotheken können nunmehr in einem weiteren Schritt wiederum mit der Testsubstanz in Kontakt gebracht werden, worauf in einem weiteren Schritt die jeweilige Bindung der Testsubstanz an die modifizierten Proteingemische, Vektoren oder Zellen der zweiten Bibliothek gemessen werden kann. Gegebenenfalls können nunmehr die Schritte des Auswählens mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle aufgrund der gemessenen Bindung und die sich daran anschließend Herstellung einer dritten bzw. n-ten Bibliothek sowie das Inkontaktbringen und Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren oder Zellen der dritten bzw. n-ten Bibliothek, ein bis n-mal wiederholt werden bis ein Proteingemisch, ein Vektor oder eine Zelle ausgewählt worden ist, das, der bzw. die die gewünschte Bindung zeigt.

Das zuvor geschilderte Verfahren wird auch als gerichtete Evolution bezeichnet, da in einer Vielzahl von Schritten die aus Modifikation und Selektion bestehen, Proteine oder Proteinfragmente „evolutionär“ hinsichtlich einer bestimmten Eigenschaft, insbesondere ihrer Bindungseigenschaft weiterentwickelt werden.

Die durch das obige Verfahren aufgefundenen oder zusätzlich hinsichtlich einer bestimmten Eigenschaft optimierten Proteine oder Proteinfragmente können, wenn sie beispielsweise auf die Aktivierung oder Repression eines bestimmten zellulären Signalwegs hin optimiert worden sind, als Wirkstoff in einem Medikament eingesetzt werden. Dasselbe gilt für die bindenden Substanzen, die in dem Verfahren zum Auffinden von potentiell bindenden Substanzen identifiziert worden sind. Daher umfassen die erfindungsgemäßen Verfahren in einer bevorzugten Ausführungsform den weiteren Schritt, daß die ausgewählte bindende Substanz oder das in dem ausgewählten Proteingemisch, in dem ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltene Protein oder Proteinfragment oder eine Variante davon mit einem pharmazeutisch akzeptablem Träger und/oder Hilfsstoff gemischt wird.

Eine „Variante“ des Proteins oder Proteinfragments beinhaltet Modifikation des N- oder C-Terminus oder Modifikation von Aminosäureseitenketten, die beispielsweise die Stabilität, Löslichkeit oder Biokompatibilität des Proteins oder Proteinfragments erhöhen. Umfaßt sind jedoch auch Fusionsproteine mit den erfindungsgemäß identifizierten Proteinen oder Proteinfragmenten, die als weitere Komponenten beispielsweise autofluoreszente Marker, wie beispielsweise GFP oder Zytostatika wie beispielsweise Choleratoxin enthalten können.

Pharmazeutisch akzeptable Träger und/oder Hilfsstoffe umfassen Substanzen, die die bindende Substanz bzw. das Protein oder Proteinfragment oder seine Varianten stabilisieren, deren pharmazeutische Verträglichkeit erhöhen oder die für die jeweilige Applikationsform, wie beispielsweise Tablette, Pflaster oder Infusionslösung, erforderlich sind, wie beispielsweise Konservierungsmittel, Puffer, Salz oder Proteaseinhibitoren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Herstellung eines Nukleinsäuregemisches nach Anspruch 10 enthaltend:

- a) mindestens eine erste Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein erstes Fusionsprotein enthaltend:
 - i) eine Interaktionsdomäne und
 - ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das erste Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird.

Dieses Kit erlaubt die Insertion einer ausgewählten Nukleinsäuresequenz 5' oder 3' von der Nukleinsäure, die für eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz kodiert, so daß im Ergebnis von der resultierenden Nukleinsäure ein Fusionsprotein kodiert wird, das am C-Terminus und/oder am N-Terminus ein durch die jeweils eingeführte Nukleinsäuresequenz kodiertes Protein oder Proteinfragment enthält. Vorzugsweise handelt es sich bei der eingeführten DNA um eine cDNA-Bibliothek, wobei diese besonders bevorzugt unter Verwendung der 3'-Restriktionsschnittstelle in die Nukleinsäure eingeführt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Kit den Leuzin-Zipper aus dem cFos-Protein und in einer weiteren Bevorzugten Ausführungsform die Tat-abhängige Proteintranslokationssequenz To-
5 rA.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits enthält das Kit des weiteren mindestens eine zweite Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein zweites Fusionsprotein enthaltend:

- 15 i) eine Interaktionsdomäne und
ii) eine Proteintranslokationsssequenz, die bewirkt, daß das zweite Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

20

Diese Nukleinsäure erlaubt die Insertion 5' oder 3' von der für eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz kodierenden Nukleinsäure, so daß im Ergebnis von der resultierenden Nukleinsäure ein Fusionsprotein kodiert wird, das am N- oder C-Terminus ein von der insertierten Nukleinsäure kodiertes Protein oder Proteinfragment umfaßt. Beispielsweise können Nukleinsäuren, die für Phagenhüllproteine kodieren in die Nukleinsäure inseriert werden, wobei diese vorzugsweise in die 3'-Restriktionsschnittstelle eingeführt werden.

25 Es hat sich gezeigt, daß wenn in die zweite Nukleinsäure Nukleinsäuren eingeführt werden, die für Phagenhüllproteine kodieren, daß die resultierenden Fusionsproteine bei starker Expression von beispielsweise dem gIIIp-Fusionsprotein zu einer hohen Toxizität für *E. coli*-Zellen führen. Aus diesem Grund wird bei klassischen Phagendisplayssystemen ein Amber-Codon 5' von dem gIII-Protein eingefügt. In Suppressorstämmen (z.B. XL-1 Blue) wird dadurch die Expression des gIIIp-Fusionsproteins um ca. 90% reduziert. Darüber hinaus ermöglicht das Amber-Codon (das in Nicht-Suppressorstämmen als STOP-Codon gelesen wird)

sehr einfach die lösliche Expression des zuvor mit dem Phagenprotein fusionierten und auf dem Phagen präsentierten Proteins, indem das Phagemid in einen Nicht-Suppressorstamm (z.B. BL21) eingebracht und dort die Expression durchgeführt wird. Daher enthält die erste und/oder die zweite Nukleinsäure in einer bevorzugten Ausführungsform entweder 5 oder 3'

5 ein Amber-Codon. Vorzugsweise ist das Amber-Codon in der ersten Nukleinsäure 5' angeordnet und in der zweiten Nukleinsäure 3' angeordnet. Dadurch läßt sich in einem geeigneten bakteriellen Wirt erreichen, daß ausschließlich das in der ersten Nukleinsäure 5' eingefügte Protein oder Proteinfragment exprimiert wird und gleichzeitig der toxische Effekt des in der zweiten Nukleinsäure 3' eingefügten gIIIp verhindert wird.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits ist die Interaktionsdomäne des zweiten Fusionsproteins die Leuzin-Zipperdomäne des cJun-Proteins. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Nukleinsäure eine Nukleinsäure, die für eine Sec-abhängige Proteintranslokationssequenz insbesondere das PelB-Führungspeptid kodiert.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer Zelle zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteingemisches sowie die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteingemisches, eines erfindungsgemäßen Vektors oder einer erfindungsgemäßen 20 Zelle zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Bibliothek.

25

Ein bevorzugtes Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen Proteingemische, erfindungsgemäßen Phagen, der erfindungsgemäßen Zellen, insbesondere der erfindungsgemäßen Bibliotheken, enthaltend vorgenannte Proteingemische, Phagen und Zellen sowie der erfindungsgemäßen Kits, ist die Präsentation von Proteinen auf filamentösen Phagen. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf Proteinen, die aufgrund ihrer Inkompatibilität mit dem Sec-Transportweg nicht mit Hilfe der klassischen Phagendisplay-Technologie präsentiert werden können. Als besonders bevorzugte Anwendungsbereiche ergeben sich daher die Präsentation und Selektion von cDNA-Expressionsbibliotheken und die Präsentation und Selektion von 30 DNA-Bibliotheken zur gerichteten Evolution von Proteinen, auch „protein engineering“ genannt.

Eine weitere bevorzugte Verwendung liegt in der Herstellung von Proteinkonjugaten. Dabei ist die Verwendung dann besonders bevorzugt, wenn das Protein oder Proteinfragment des

ersten Fusionsproteins und das Protein oder Proteinfragment des zweiten Fusionsproteins jeweils unterschiedliche Anforderungen hinsichtlich der zur korrekten Faltung erforderlichen zellulären Umgebung haben. So erlaubt es die vorliegende Erfindung Antikörper direkt mit Markerproteinen gentechnisch zu fusionieren, die bei Produktion in Bakterien und Transport
5 über den Sec-abhängigen Transportweg nicht korrekt gefaltet würden und daher bei Anwendung von Standardverfahren nicht als Markerprotein zur Markierung des Antikörper verwendet werden können. Markerproteine-Antikörperfusion, deren funktionelle Expression erst durch die vorliegende Erfindung möglich geworden ist, umfassen beispielsweise Fusionen aus autofloreszierenden Proteine, wie GFP und schweren Immunoglobulinketten, leichten Immuno-
10 noglobulinketten oder „single-chain-antibodies“.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele dienen lediglich der Illustration der Erfindung und sind nicht als Beschränkung derselben auf die konkret in den Beispielen angegebenen Ausführungsformen zu verstehen. Alle im Text enthaltenen Zitate werden hierdurch in ihrem gesamten Umfang durch Verweis aufgenommen.
15

Abbildungen

- Abb. 1 Konsensussequenzen Tat-abhängiger, Sec-abhängiger, SRP-abhängiger oder YidC-abhängiger Signalsequenzen, wobei X eine beliebige Aminosäure und # eine hydrophobe Aminosäure präsentieren.
20
- Abb. 2 Tat-abhängiges TorA-Signalpeptid, wobei X eine beliebige Aminosäure und # eine hydrophobe Aminosäure präsentieren
25
- Abb. 3 Prinzip des TLF-Systems, wobei CT die Domäne des pIII, pelB die Sec-Signalsequenz, TSS die Tat-Signalsequenz und POI das präsentierte Protein bedeuten.
30
- Abb. 4 Restriktionskarte des Plasmids pCD4/GFP24, dessen Nukleinsäuresequenz als SEQ ID NR: 1 im Anhang wiedergegeben ist.
- Abb. 5 Restriktionskarte des Plasmids pCA1/GFP24, dessen Nukleinsäuresequenz in SEQ ID NR: 2 wiedergegeben ist.

Abb. 6 Restriktionskarte des Plasmids pCN1/GFP24, dessen Nukleinsäuresequenz in SEQ ID NR: 3 wiedergegeben ist.

5 Abb. 7 Kompetitiver Phagen-ELISA, wobei weiße Balken die Ergebnisse mit GFP24-präsentierende Phagen zeigen. GFP24-Phagen wurden mit Hilfe von XL-1 Blue Zelle hergestellt, die das Plasmid pCD4/GFP24 tragen. Graue Balken präsentieren die Ergebnisse, die mit β -Lactamase-tragenden Phagen erzielt wurden. β -Lactamase-präsentierende Phagen wurden in XL-1 Blue Zelle hergestellt, die das Plasmid pCD4/BLA trugen.

10

Abb. 8 Enzymatischer Assay, der Präsentation von β -Lactamase auf Bakteriophage, wobei weißen Kreise die Ergebnisse mit GFP24-tragende Phagen zeigen. GFP24-Phagen wurden mit Hilfe von XL-1 Blue Zelle hergestellt wurden, die das Plasmid pCD4/GFP24 tragen. Schwarze Vierecke präsentieren die Ergebnisse die mit β -Lactamase-tragenden Phagen erzielt wurden. β -Lactamase-präsentierende Phagen wurden in XL-1 Blue Zelle hergestellt, die das Plasmid pCD4/BLA trugen. Gezeigt wird die Absorption bei 486 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

20

Beispiele

Beispiel 1: Verwendete Vektoren

25

pCD4/GFP24 ist ein Cysteindisplay-Phagemid, das auf dem pGP-Vektor (Paschke M., et al.: (2001) Biotechniques 30: 720-725) beruht.

30 pCA1/GFP24 ist ein Cysteindisplay-Phagemid, das auf pGP-F100 basiert. Es kann für die tet^{o-p} -kontrollierte Expression von Protein als Fusion von cFos-Leuzin-Zipper verwendet werden. Die Translokation des cFos-Fusionsproteins im periplasmatischen Raum wird durch die TorA-Führungspeptidsequenz (Tat-abhängige Translokationsweg) vermittelt. Das tet^{o-p} -kontrollierte Transkript enthält ein zweites Cistron, von dem das c-jun::G3Ps-Fusionsprotein exprimiert wird. Das c-Jun::G3Ps wird über den Sec-abhängigen Translokationsweg in dem

periplasmatischen Raum gesteuert. Kovalente Komplexe zwischen dem cFos-Fusionsprotein und dem cJun::G3PS-Fusionsprotein werden im periplasmatischen Raum aufgrund der Dimerisierung von cJun und cFos und anschließender Ausbildung von Cysteinbindungen zwischen den Proteinen hergestellt. Das Phagemid enthält eine GFP24-Kassette, flankiert von SfiI-Restriktionsstellen an den Positionen 148 und 910 und ist zwischen dem TorA-Führungspeptid und cFos angeordnet. Diese Kassette muß durch das zu präsentierende Protein ersetzt werden.

pCA1/GFP24 ist ein von pCD4 abgeleitetes Cysteindisplay-Phagemid, das auf dem pGP-Vektor basiert. pCD4/GFP24 ist ein Cysteindisplay-Phagnid, das auf dem pGP-Vektor (Paschke M., et al.: (2001) Biotechniques 30: 720-725) beruht. Es kann für die $\text{tet}^{\text{o-p}}$ -kontrollierte Expression von Proteinen als Fusion mit dem cFos-Leucinzipper verwendet werden. Die Translokation des cFos-Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum wird durch das TorA-Führungspeptid (Tat-Transportweg) vermittelt. Das $\text{tet}^{\text{o-p}}$ -kontrollierte Transkript 15 enthält ein zweites Cistron, von dem das c-jun::G3Pss Fusionsprotein exprimiert wird (G3Pss umfaßt Aminosäuren 252 bis 406 des reifen gIII-Proteins des fd-Phagen). Das c-jun:G3Pss wird durch einen Sec-abhängigen Transportweg (pelB-Führungspeptid) in dem periplasmatischen Raum gelenkt. Kovalente Komplexe von cFos-Fusionsprotein und c-jun::G3Pss werden aufgrund der Dimerisierung zwischen cJun und cFos im periplasmatischen Raum und die anschließende Ausbildung von Cysteinbindung zwischen den Proteinen gebildet (Crameri, R. und Suter M. (1993), siehe oben). Der Phagendisplay der Proteine, die mit cFos fusioniert sind, kann durch sogenannten Helperphargenrescue erreicht werden. Im Gegensatz zu pGP 20 überträgt das Phagemid pCD4-GFP24 Chloramphenicolresistenz. Das Resistenzgen (CAT) und der tet-Repressor (TetR) werden unter Kontrolle des β -Lactamasepromotors von einer 25 bicistronischen Kassette kontrolliert. Das Transkript wird in einem λ -Phagenterminator terminiert. Die Tat-TetR-Kassette ist in umgekehrter Orientierung zu der cFos- und cJun-Fusionskassette. Eine GFP24-Kassette, flankiert an der Position 148 und 910 von SfiI-Restriktionsstellen ist zwischen dem TorA-Führungspeptid und cFos angeordnet. Diese Kassette wird durch das zu präsentierenden Protein ersetzt.

30

pCD4/Bla ist ein von pCD4/GFP24 abgeleitetes Cysteindisplay-Phagemid, bei dem mittels Restriktion mit SfiI das GFP24 Fragment durch die Sequenz der reifen TEM1 β -Lactamase ersetzt wurde. Die eingefügte Lactamaseklonierungskassette mit 5' und 3'-terminalen SfiI-Restriktionsstellen ist in SEQ ID NR: 4 wiedergegeben.

Beispiel 2: Herstellung von Bakteriophagen

Mit dem entsprechenden Phagemid transformierte XLI-Blue-Zellen wurden in 2 TY-
5 Selektionsmedium bei 30°C bis zu einem OD_{600nm} von 0,5 kultiviert und dann mit dem Helferphagen VCSM13 mit einem Moi = 10-20 gemischt. Die infizierte Kultur wurde für 30 Minuten bei 37°C kultiviert und anschließend mit Kanamizin in einer Endkonzentration von 60 µg/ml versetzt. Die Kultur wurde für 10 Minuten bei 25°C kultiviert. Durch Zentrifugation
10 (4000 x g, 4°C, 5 Minuten) wurden die Zellen geerntet und anschließend in 2 TY- Selektionsmedium enthaltend 60 µg/l Kanamizin und 0,5 µg/ml Tetracyclin resuspendiert. Diese Kultur wurde für 5 h bei 25°C kultiviert. Anschließend folgte die Phagenpräparation aus dem Zellkulturüberstand wie folgt: Jeweils 40-50 ml Zellen und Zelltrümmer wurden
durch Zentrifugation (4°C, 10.000 rpm in einem A8-24-Rotor für 15 Minuten) vom phagen-
haltigen Zellkulturüberstand getrennt. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter fil-
15 triert und mit ¼ Volumen PEG-NaCl-Lösung (20% w/v PEG 8000, 50% w/v NaCl) gemischt und über Nacht oder für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde dann bei 4°C für 15 min bei 15.000 rpm in einem A8.24-Rotor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 2,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und auf 2 ml Plastikröhrchen verteilt. Dann wurde der Überstand mit ¼ Volumen PEG-NaCl-Lösung gemischt und für mindestens eine
20 weitere Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand bei 4°C und 14.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Phagenniederschlag wurde in 0,5-1 ml PBS gelöst. Gege- benfalls wurde die Phagenlösung durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und anschließend bei 4°C gelagert. Bei längerer Lagerung wurde die Phagenlösung mit 1 Volumen Glycerol ver- setzt und bei -70°C gelagert.

25

Der Phagentiter wurde durch Standardverfahren unter Verwendung einer Verdünnungsreihe bestimmt. Der Titer lag üblicherweise zwischen 10¹² und 10¹³ cfu/ml.

Beispiel 3: Präsentation von funktionellem GFP24 auf Phagen

30

GFP24 ist eine zirkulärpermutierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins, die zusätzlich ein Epitop des P24-Proteins aus HIV enthält (Höhne, W.E. et al. (1993) Mol Immunol 30:1213-21). GFP24 wird durch den anti-P24-Antikörper CB4-1 (Dr. Scholz, Institut für Bio- chemie, (Universitätsklinikum Charite)) mit hoher Affinität gebunden. GFP24 kann wie auch

GFP selbst nicht über den Sec-Transportweg exportiert werden. Ein funktionelles GFP24 Protein sollte daher bei Expression des oben geschriebenen pCD4/GFP24-Plasmids nur dann zur Präsentation eines funktionsfähigen GFP24 führen, wenn dieser Teil des Proteins nicht durch einen Sec-abhängigen Transportweg, sondern durch einen Tat-abhängigen Transportweg in das Periplasma transportiert worden ist. Um GFP24 auf filamentösen Phagen nachzuweisen, wurde ein Phagen-ELISA wie folgt durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit 10 µm/ml anit-P24Antikörper-C4-1 beschichtet, dreimal mit PBS/Tween 0,1% gewaschen und mit 200 µl pro Vertiefung Genosys-Blockierungsreagenz (Sigma-Genosys Ltd, Cambridge, UK)) für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die 10 Mikrotiterplatte dreimal mit PBS/Tween 20 0,1% gewaschen. Anschließend wurden 50 µl pro Vertiefung GFP24 präsentierende Phagen mit und ohne P24-Peptid in die Mikrotiterplatte gegeben und anschließend die Gegenwart des Phagen in der Mikrotiterplatte mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Phagen-Antikörper (Serum Diagnostica GmbH, Döllgenbrodt, Germany)) nachgewiesen. Die Signalstärke entsprach dabei dem an CB4-1 gebundenen Phagen. pCD4/GFP24 Phagen wurden dabei vollständig von CB4-1 durch das P24-Peptid verdrängt, während β- Lactamase präsentierende Phagen (pCD4/BLA), die als Kontrolle verwendet wurden, nicht an CB4-1 gebunden wurden. Darüber hinaus konnte keine unspezifische Bindung an anderer Antikörper oder das Blockierungsreagenz beobachtet werden (s. Abb. 7).

20

Beispiel 4: Präsentation von TEM-1-β- Lactamase auf filamentösen Phagen

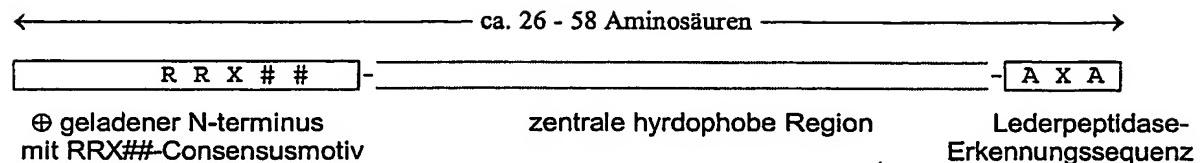
TEM-1-β-Lactamase ist ein periplasmatischen Protein, das durch die Hydrolyse des Lactamrings des Antibiotikums Ampicillin Resistenz gegen Ampicillin vermitteln kann. TEM-β-25 Lactamase wird normalerweise mittels des Sec-abhängigen Transportsystems ins Periplasma exportiert. Zum Nachweis, daß TEM-1-β- Lactamase auch durch den Tat-abhängigen Transportweg exportiert werden kann, wurde die Sec-Signalsquenze entfernt und durch die TorA-Sequenz ersetzt. Die erfolgreiche Präsentation von TEM-1-β- Lactamase wurde mit dem nachfolgend beschriebenen Enzymessay nachgewiesen, dessen Ergebnis in Abb. 8 dargestellt 30 ist. 800 µl PBS pH 7,4 wurden mit 100 µl Nitrocefin-Stammlösung (500 µg/ml) gemischt und auf 25°C temperiert. 100 µl Phagenlösung wurden hinzugegeben. Die Extinktionsänderung bei 486 nm wurde photometrisch über 10 min. beobachtet. Die Absorptionsänderung bei 486 nm entspricht dabei der β-Lactamaseaktivität der Phagen. Während pCD4/GFP24-Phagen

keine β -Lactamaseaktivität zeigten, war bei pCD4/BLA eine starke β -Lactamaseaktivität zu beobachten.

Die Nitrocefinstammlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 1 mg Nitrocefin wurd in 100 5 μ l DMSO gelöst. Diese Lösung wurde dann mit 1,9 ml PBS pH 7,4 gemischt. Die Lösung wurde für maximal zwei Wochen bei –20°C gelagert.

Abb. 1

Tat-abhängige Signalsequenz



Sec-, YidC- und SRP-abhängige Signalsequenz

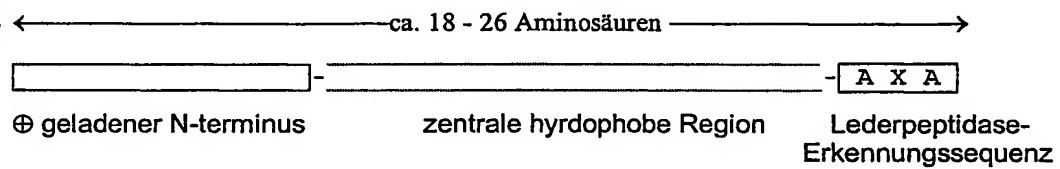


Abb. 2

M N N N D L F Q A S R R R F L A Q L G G L T
ATGAACA ATAACGATCT CTTTCAGGCA TCACGTGGC GTTTCTGGC ACAACTCGGC GGCTTAACCG
TACTTGT TATTGCTAGA GAAAGTCCGT AGTGCAGCCG CAAAAGACCG TGTTGAGCCG CCGAATTGGC

R R X # # -

⊕ geladener N-terminus mit RRX##-Consensusmotiv

zentrale hydrophobe Region

V A G M L G P S L L T P R R A T A
GTCGCCGGGAT GCTGGGGCCG TCATTGTTAA CGCCGCGACG TGCGACTGCG
CACCGGCCCTA CGACCCCGGC AGTAACAATT GCGCGCTGC ACGCTGACGC

- [A X A]

zentrale hydrophobe Region

Lederpeptidase-
Erkennungssequenz

Abb. 3

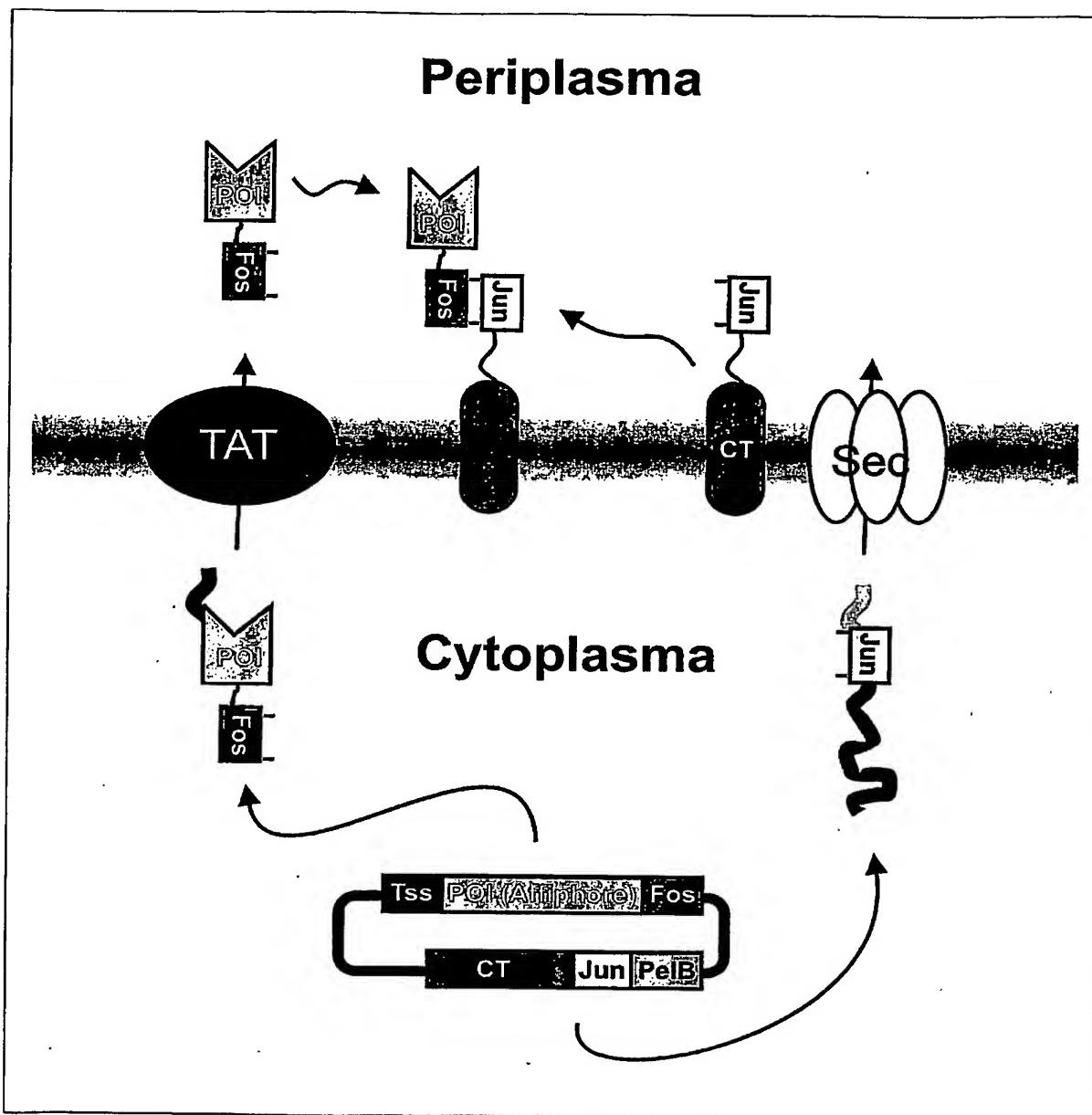


Abb. 4

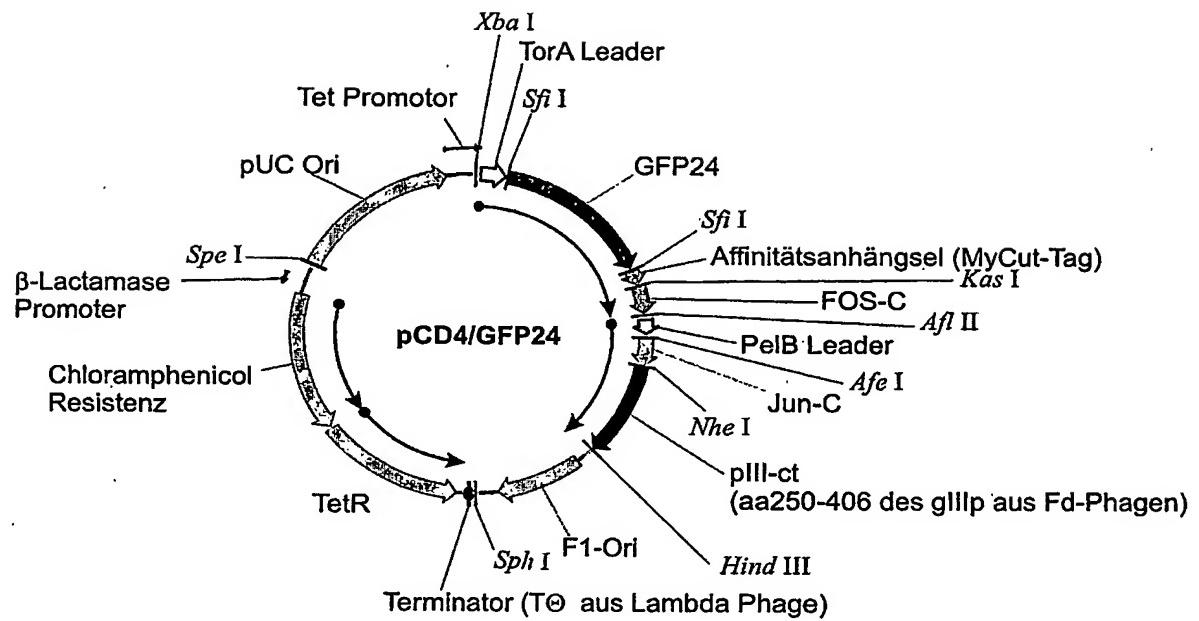


Abb. 5

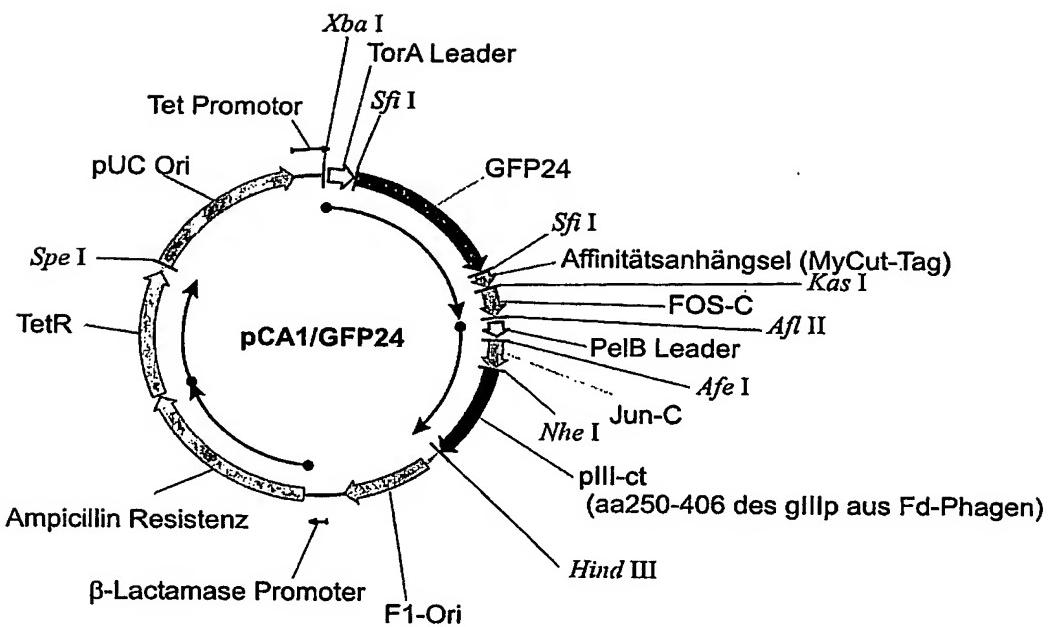


Abb. 6

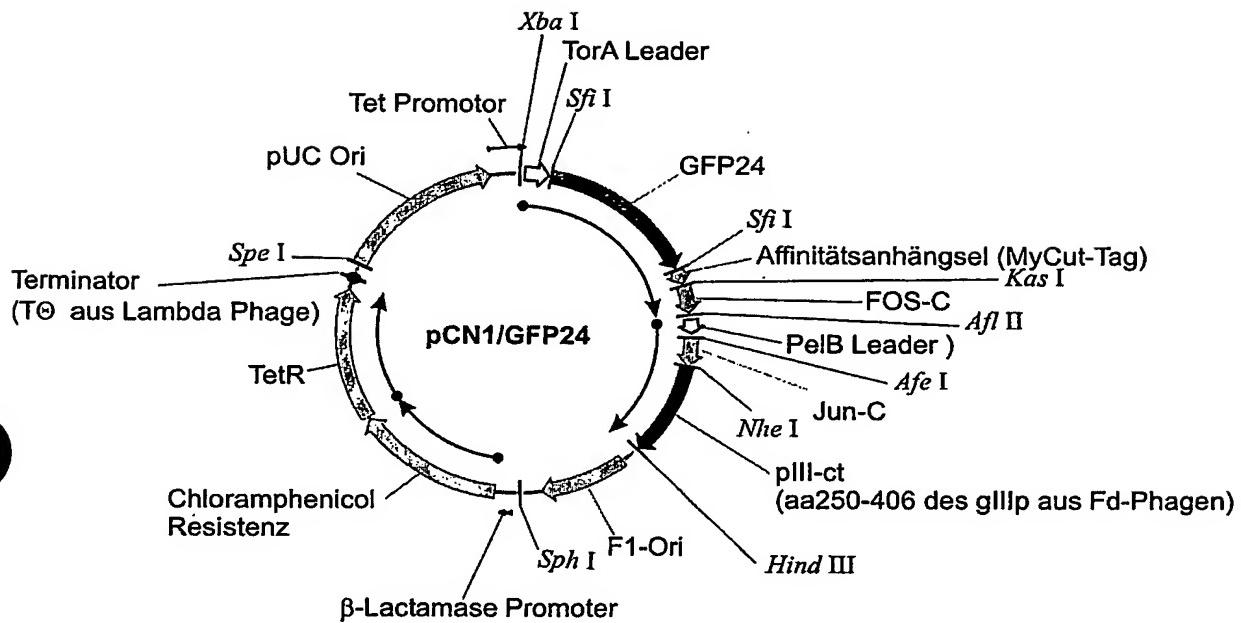


Abb. 7

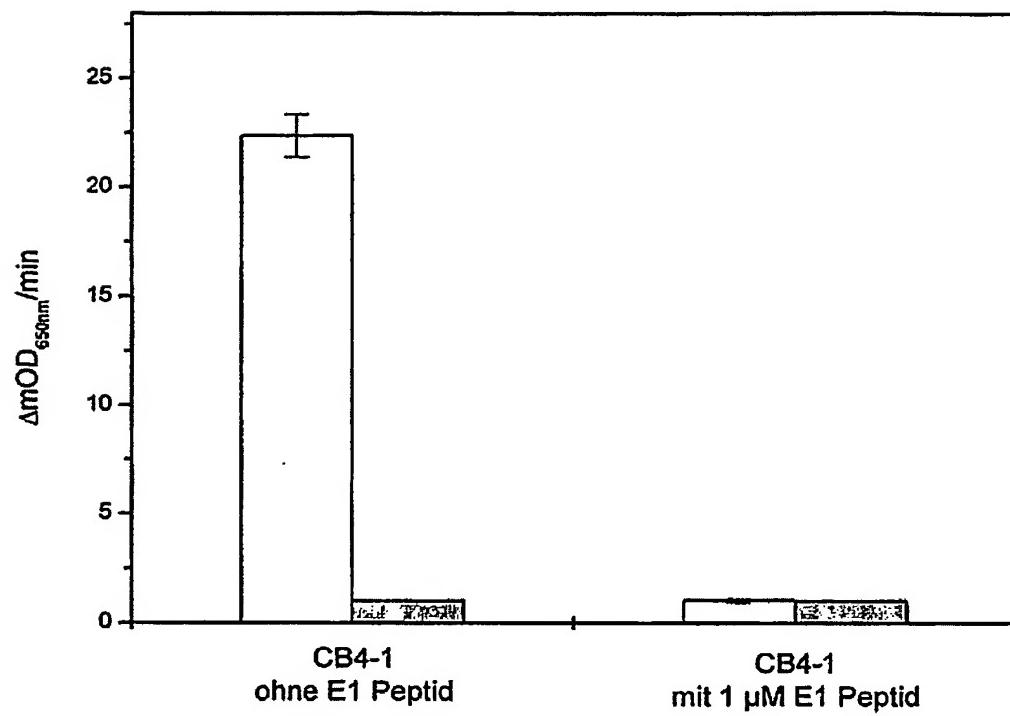
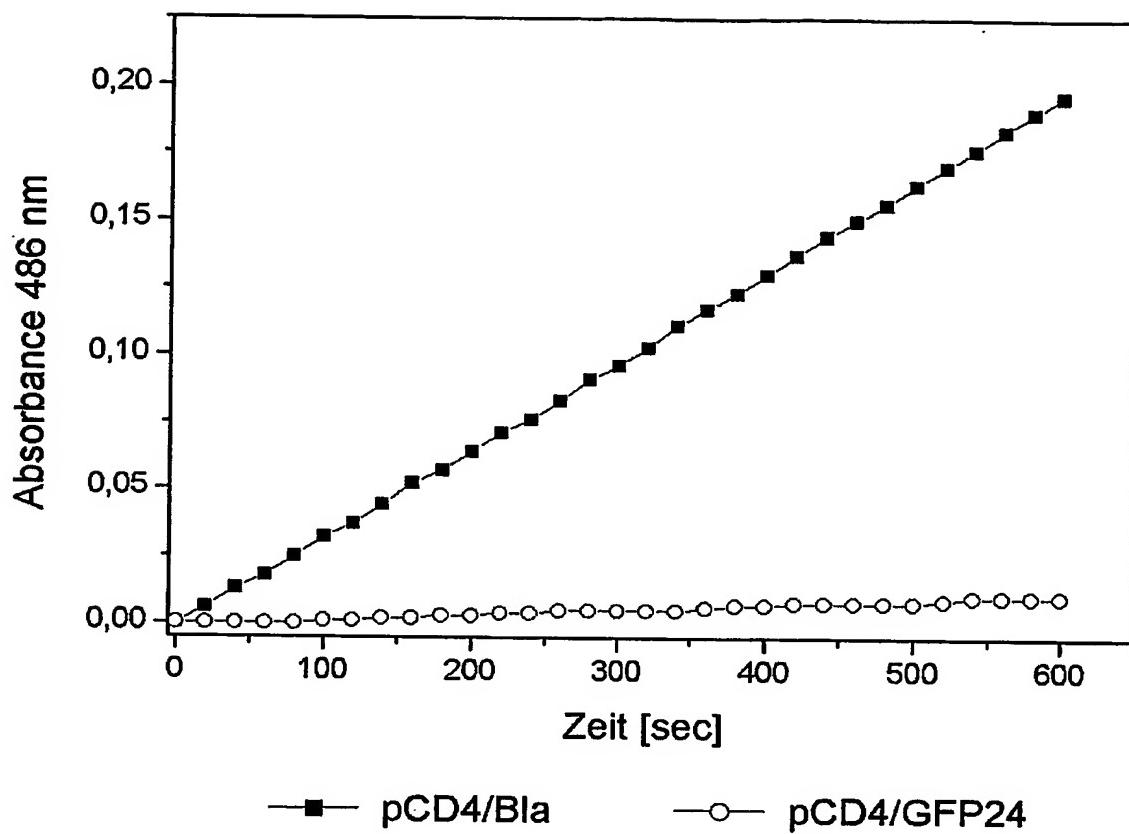


Abb. 8



Anprüche

1. Proteingemisch enthaltend:

5 a) mindestens ein erstes Fusionsprotein enthaltend:

- i) ein Protein oder Proteinfragment,
- ii) eine Interaktionsdomäne und
- iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird,

und

15 b) mindestens ein zweites Fusionsprotein enthaltend:

- i) ein Protein oder Proteinfragment,
- ii) eine Interaktionsdomäne und
- iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird,

20 wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

25

2. Proteingemisch nach Anspruch 1, wobei das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins eine schwere Immunoglobulinkette, eine leichte Immunoglobulinkette, ein single-chain Antikörper, ein Diabody, ein Rezeptor, ein Rezeptorligand, ein Integrin, ein Intimin, ein Kohlenhydrat-bindendes Protein, ein Albumin-bindendes Protein oder Protein A ist.

30

3. Proteingemisch nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein oder Proteinfragment des zweiten Fusionsproteins ein autofluoreszierendes Protein, insbesondere GFP oder eine Variante davon, ein Enzym, ein Cofaktor-abhängiges Protein, ein Protein, das von einer aus einer cDNA-Bibliothek stammenden cDNA kodiert wird, oder ein synthetisches Protein ist.
- 5
4. Proteingemisch nach Anspruch 1, wobei das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins und die Proteintranslokationssequenz ein Phagenhüllprotein, ein periplasmatisches Markerenzym, ein Intimin, ein Protein der äußeren Bakterienmembran oder ein periplasmatisches Rezeptorprotein ist.
- 10
5. Proteingemisch nach Anspruch 4, wobei das Phagenhüllprotein ausgewählt ist aus den M13-Phagenhüllproteinen pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX.
- 15 6. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Interaktionsdomänen des ersten und zweiten Fusionsproteins jeweils eine Leuzin-Zipper-Domäne und eine Leuzin-Zipper-Domäne, eine Helix-Loop-Helix-Domäne und eine Helix-Loop-Helix-Domäne, ein Calmodulin und ein Calmodulin-bindendes Peptid oder ein Peptid-Dimer-Paar natürlichen oder synthetischen Ursprungs sind.
- 20
7. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Proteintranslokationssequenz des ersten Fusionsproteins eine Sec-abhängige, SRP-abhängige, YidC-abhängige Sequenz oder eine Transportweg-unabhängige Sequenz, die in die Membran integriert wird, ist.
- 25
8. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Proteintranslokationssequenz des zweiten Fusionsproteins eine Tat-abhängige oder Thylakoid- Δ pH-abhängige Sequenz ist.
- 30 9. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das erste Fusionsprotein an das zweite Fusionsprotein kovalent oder nicht-kovalent gebunden ist.
10. Nukleinsäuregemisch kodierend für ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

11. Nukleinsäuregemisch nach Anspruch 10, wobei mindestens zwei Nukleinsäuren, die für unterschiedliche Fusionsproteine kodieren, kovalent miteinander verbunden sind.
- 5 12. Vektor enthaltend ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder ein Nukleinsäuregemisch nach einem der Ansprüche 10 oder 11.
- 10 13. Zelle enthaltend ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9, ein Nukleinsäuregemisch nach einem der Ansprüche 10 oder 11 und/oder einen Vektor nach Anspruch 12.
- 15 14. Bibliothek enthaltend mindestens zwei Proteingemische nach einem der Ansprüche 1 bis 9, mindestens zwei Vektoren nach Anspruch 12 und/oder mindestens zwei Zellen nach Anspruch 13, wobei die Proteine oder Proteinfragmente der jeweiligen ersten oder jeweiligen zweiten Fusionsproteine voneinander unterschiedlich sind.
- 20 15. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die an ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9, an einen Vektor nach Anspruch 12 oder an eine Zelle nach Anspruch 13 binden, enthaltend die Schritte:
 - a) In-Kontaktbringen mindestens einer potentiell bindenden Substanz mit einem Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9, einem Vektor nach Anspruch 12 und/oder einer Zelle nach Anspruch 13 und
 - 25 b) Messen der Bindung der potentiell bindenden Substanz an das Proteingemisch, den Vektor und/oder die Zelle.
16. Verfahren zum Auffinden von Proteinen oder Proteinfragmenten, die an eine Testsubstanz binden, enthaltend die Schritte:
 - a) In-Kontaktbringen mindestens einer Testsubstanz mit einer Bibliothek nach Anspruch 14 und

- b) Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren und/oder Zellen der Bibliothek.

17. Verfahren nach Anspruch 16 enthaltend die weiteren Schritte:

5

- a) Auswählen mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle auf Grund der gemessenen Bindung und
- b) Herstellen einer zweiten Bibliothek, wobei die Bibliothek durch Modifikation des im ausgewählten Proteingemisch, im ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltenden Proteins oder Proteinfragments erzeugt wird.

10

18. Verfahren nach Anspruch 16 enthaltend die weiteren Schritte:

15

- a) Auswählen mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle auf Grund der gemessenen Bindung,

20

- b) Herstellen einer zweiten Bibliothek, wobei die Bibliothek durch Modifikation des im ausgewählten Proteingemisch, im ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltenden Proteins oder Proteinfragments erzeugt wird,

- c) In-Kontaktbringen mindestens einer Testsubstanz mit der zweiten Bibliothek,

25

- d) Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren oder Zellen der zweiten Bibliothek und

- e) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte a) bis d) bis ein Proteingemisch, ein Vektor oder eine Zelle ausgewählt wird, das, der bzw. die die gewünschte Bindung zeigt.

30

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei in einem weiteren Schritt die bindende Substanz oder das in dem ausgewählten Proteingemisch, in dem ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltende Protein oder Proteinfragment oder

eine Variante davon mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder Hilfsstoff gemischt wird.

20. Kit zur Herstellung eines Nukleinsäuregemisches nach Anspruch 10 enthaltend:

5

- a) mindestens eine erste Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein erstes Fusionsprotein enthaltend:
 - i) eine Interaktionsdomäne und
 - ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das erste Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird.

10 21. Kit nach Anspruch 20, desweiteren enthaltend:

20

- a) mindestens eine zweite Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein zweites Fusionsprotein enthaltend:
 - i) eine Interaktionsdomäne und
 - ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das zweite Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird,

25

wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

22. Verwendung einer Zelle nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Proteingemisches
30 nach einem der Ansprüche 1-9.

23. Verwendung eines Proteingemisches nach einem der Ansprüche 1 bis 9, eines Vektors nach Anspruch 12 und/oder einer Zelle nach Anspruch 13 zur Herstellung einer Bibliothek nach Anspruch 14.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Proteingemisch, enthaltend mindestens ein erstes Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in ein Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, und mindestens ein zweites Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Charité
<120> Gemisch mindestens zweier Fusionsproteine sowie ihre Herstellung und Verwendung
<130> U30038
<160> 4
<170> Word 98, Windows
<210> 1
<211> 4765
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<220>
<221> pCD4/GFP24 Klonierungs- und Expressionsvektor
<400> 1

ctagataaga aggaagaaaa ataatgaaca ataacgatct ctttcaggca tcacgtcgcc 60
gttttctggc acaactcggc ggcttaaccg tcgcccggat gctggggccg tcattgttaa 120
cgccgcgacg tgcgactgcg gcccagccgg ccatggcggg atccgttcaa ctgcagacc 180
attatcaaca aaatactcca attggcgatg gccctgtcct tttaccagac aaccattacc 240
tgtcgacaca atctgcctt tcaaagatc ccaacgaaaa gcgtgaccac atgtccttc 300
tttagttgt aactgctgct gggatttccg gtgggtgtgg tgctaccgg cagcacctga 360
acaccatgtt ggggtgtgt ggttagtaaag gagaagaact tttcacttgg gttgtccaa 420
ttcttgttga attagatgtt gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg 480
aagggtatgc aacatacgg a aacttaccc taaaatttat ttgcactact ggaaaactac 540
ctgttccatg gccaacactt gtcaacttct tctcttatgg tggtaatgc tttcccggt 600
atccggatca tatgaaacgg catgacttt tcaagagtgc catgcccggaa gtttatgtac 660
aggaacgcac tatatcttc a aagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt 720
ttgaaggtga taccctgtt aatcgatcg agttaaaagg tattgattt aaagaagatg 780
gaaacattct cggacacaaa ctcgagtaca actataactc acacaatgtt tacatcacgg 840
ca gacaaaaca aaagaatggg atcaaaagcta acttcaaaat tcgcccacaac attgaagatt 900
cggcctcggg ggccgcagaa caaaaactca tctcagaaga gaatctgtat ttccagggcg 960
atgcctgcgg tggcaccgac accctgcaag ctgaaaaccga ccagctggaa gacgagaaat 1020
ccgcctctgca gactgaaatc gctaaccctgc tggaaagagaa agagaaaactg gaattcatc 1080
tggctgtca cggcgggtgt gggcttaggct aataacttgg gccaaggagg aaaataaaat 1140
gaaataccta ttgcctacgg cagccgctgg attgttatta ctcgcggcac agccggccat 1200
ggcaagcatc tgccgtggcc gtatcgctcg tctgaaagaa aaagttaaaa ccctgaaagc 1260
tcagaactcc gaactggctt ccaccgctaa catgctgcgt gaacaggtt ctcagctgaa 1320
gcagaaaatg atgaaccacg gccggtgtgg tggcggttcc ctacgggct ccggttccgg 1380
tgattttgtat tatgaaaaaaa tgcaaacgc taataagggg gctatgaccg aaaatgccg 1440
tgaaaacgcg ctacagtctg acgctaaagg caaacttgc tctgtcgctt ctgattacgg 1500
tgctgtatc gatggttca ttggtgacgt ttccggcctt gctaatggta atggtgctac 1560
tggtgatttt gctggctcta attcccaaat ggctcaagtc ggtgacggtg ataattcacc 1620
tttaatgaat aatttccgtc aatatttacc ttcttgcct cagtcgggtt aatgtcgccc 1680
ttatgtctt ggcgctggta aaccatatga attttctatt gattgtgaca aaataaaactt 1740
attccgtgtt gtctttgcgt ttctttata tggccacc ttatgtatg tattttcgac 1800
gtttgctaact atactgcgtt ataggagtc ttaataagct tgacctgtga agtggaaaat 1860
ggcgcacatt gtgcgacatt tttttgtct gccgttacc gctactgcgt cacggatctc 1920
cacgcgcctt gtagcggcgc attaagcgcg gccccgttgg tggttacgcg cagcgtgacc 1980
gctacacttg ccagccccctt agcgccccgtt ccttcgcctt tcttccttc ctgtcgcc 2040
acgttcgcgc gctttccccgtt ctaagctcta aatcggggc tccctttagg gttccgattt 2100
agtgcatttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgtatggc acgttagtgg 2160
ccatgcgcctt gatagacggt tttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt cttaatagt 2220
ggactcttgtt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattt ttttgattta 2280
taagggattt tgccgatttc ggcctattgg taaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 2340
aacgcgcattt ctaacaaaat attaaaaaac gcccggcggc aaccgagcgt taatagtggaa 2400

gttaccatca cgaaaaaagg ttatgctgct ttaagaccc actttcacat ttaagttgtt 2460
 tttctaattcc gcataatgatc aattcaaggc cgaataagaa ggctggctct gcaccttggt 2520
 gatcaaataa ttcgatacg tgcgtaata atggcgcat actatcgta gtaggtgtt 2580
 cccttccttc ttagcgact tgatgctctt gatctccaa tacgcaacct aaagtaaaaat 2640
 gccccactgc gctgagtgca tataatgcat tctctagtga aaaaccttgt tggcataaaa 2700
 aggctaattg atttcgaga gtttcataact gttttctgt aggccgtgt ccttaatgtt 2760
 ctttgcgtcc atcgcgtatc cttagtaaag cacatctaa acttttagcg ttattacgtt 2820
 aaaaatcttgc ctagcttcc cttctaaag ggcaaaagtg agtatggtc ctatctaaca 2880
 tctcaatggc taaggcgctg agcaaagccc gcttatttt tacatgcca tacaatgttag 2940
 gctgctctac acctagctt cggcgagtt tacgggttgt taaaccttcg attccgaccc 3000
 cattaaggcag ctctaatgct ctgttaatca cttagtattt atctaaacga gacatcatta 3060
 attccttattt cggccccccc tggcactcat cgcgtactg ttgtaatttca ttaagcattc 3120
 tgccgacatg gaagccatca caaacggcat gatgaacctg aatcgccagc ggcqtcagca 3180
 ccttgcgtcc ttgcgtataa tatttgcctaa tagtggaaac gggggcgaag aagttgtcca 3240
 tattggccac gtttaatca aaactgggtga aactcaccctt gggattggct gagacgaaaa 3300
 acatattctc aataaaccctt ttagggaaat aggccagggtt ttcaccgtaa cacccacat 3360
 cttgcgataa tatgtgtttag aactgcccgg aatcgctgt gtattcactc cagagcgatg 3420
 aaaacgttcc agtttgcgtca tgaaaaacgg tgtaacaagg gtgaacacta tcccatatca 3480
 ccagctcacc gtcttcatt gccatacggtt attccggatg agcattcatc aggcgggca 3540
 gaatgtgaat aaaggccgga taaaacttgc gtttattttt cttagcggtc tttaaaaagg 3600
 ccgttaatatc cagctgaacg gtctgggttat aggtacattt agcaactgac tgaatgcct 3660
 caaaatgttc ttacgatgc cattgggata tatcaacggt ggtatatttca gtgattttt 3720
 ttccttactt cttctttt caatattttt gaagcatttta tcagggttat tgtctcatgt 3780
 gcgatatacat atttgaatgt attttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacattt 3840
 cccgaaaagt gccacctgaa atttgaagcg ttacttagttt aaaaggatct aggtgaagat 3900
 ccttttgcgtt aatctcatga cccaaatccc ttacgttgc gttttgcggg atcaagagct 3960
 agaccccgta gaaaagatca aaggatctt ttgagatctt tttttctgc gctaatctg 4020
 ctgcttgcgtt aaaaaaaaaac caccgttacc agcgggtgtt tttttgcggg atcaagagct 4080
 accaactctt ttccgttacc taactgggtt cagcagagcg cagataccaa atactgttct 4140
 tctagtgttag cctgtttag gcccaccactt caagaactct gtacgttgc ctacataacct 4200
 cgctctgtca atccgttttac cagtggtgtc tgccagtggc gataagtctgt gtcttaccgg 4260
 gttgactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcg tcgggctgaa cgggggggttc 4320
 gtgcacacag cccagcttgc agcgaacgc ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4380
 gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaaagg gagaaaggcg gacaggttac cggtaagcgg 4440
 cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcctt ggtatcttta 4500
 tagtctgtc gggtttgcgtt acctctgact tgagcgtcga tttttgcgtat gctcgtcagg 4560
 gggggggggc ctatggaaaa acgcccggccaa cgcggccctt ttacgttgc tggcctttt 4620
 ctggcctttt gtcacatgtt cccgacacca tcgaatggcc agatgattaa ttcctaattt 4680
 ttgttgacac tctatcattt atagagttt tttaccactc cctatcgtt atagagaaaa 4740
 gtgaaatgaa tagttcgaca aaaaat 4765

<210> 2
 <211> 4971
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> pCA1/GFP24 Klonierungs- und Expressionsvektor

<400> 2

ctagataaga	aggaagaaaa	ataatgaaca	ataacgatct	cttcaggca	tcacgtcgcc	60
gttttctggc	acaactcggt	ggcttaaccg	tcgcccggat	gctggggccg	tcattgtttaa	120
cggccgacg	tgcgactgtc	gcccagccgg	ccatggccgg	atccgttcaa	ctagcagacc	180
attatcaaca	aaatacttca	atttggcgat	gcccgttctt	tttaccagac	aaccattacc	240
tgtcgacaca	atctggccctt	tcgaaaagatc	ccaaacggaaa	gctgtgaccac	atggcccttc	300
ttgagttgt	aactgtgtt	gggatttccg	gtgggtgg	tgctaccccg	caggacctga	360
acaccatgt	gggtgggt	ggttagtaaag	gagaagaact	tttcactgg	gttgcgtccaa	420
ttcttgcgtt	attagatgtt	gatgttaat	ggcacaaatt	ttctgtcagt	ggagaggggt	480
aagggtatgc	aacatacggt	aaacttaccc	ttaaatttat	ttgcactact	ggaaaactac	540
ctgttccatg	gccaacactt	gtcactactt	tctcttatgg	tgttcaatgc	tttcccggt	600
atccggatca	tatgaaacgg	catgactttt	tcaagagtgc	catgcccggaa	gttatgtac	660
aggaacgcac	tatatcttc	aaagatgacg	ggaactacaa	gacgcgtgt	gaagtcaagt	720

ttgaaggtga tacccttgg	aatcgatcg agttaaaaagg	tattgatttt aaagaagatg	780
gaaacattct cggacacaaa	ctcgagtaca actataactc	acacaatgt tacatcacgg	840
cagacaaaca aaagaatgga	atcaaagcta acttcaaaaat	tcgcccacaac attgaagatt	900
cgccctcgaa ggcgcagaa	caaaaactca tctcagaaga	gaatctgtat ttccagggcg	960
ggcccaaacc ttccaccccg	cctggttctt caggcgcctg	cggtggcctg accgacaccc	1020
tgcaagctga aaccgaccag	cttggaaagacg agaaaatccgc	tctgcagact gaaatcgcta	1080
acotgctgaa agagaaagag	aaactggaaat tcattctggc	tgctcacggc ggttgttaat	1140
aacttaagcc aaggagggaa	ataaaatgaa atacatttgc	cctacggcag ccgctggatt	1200
gttattactc gtcggcaac	cagcgatggc cgcacagggtt	aaactgctcg agagcgctt	1260
cggtggccgt atcgctcg	tggaagaaaa agttaaaaacc	ctgaaagctc agaactccga	1320
actggcttcc accgctaaca	tgctgcgtga acagggtgct	cagctgaagc agaaagttat	1380
gaaccacggc ggttgtgcta	gcgggtggcgg ctccgggtcc	ggtgattttg attatgaaaa	1440
aatggcaaac gctaataagg	gggctatgac cggaaatgcc	gatgaaaacg cgctacagtc	1500
tgacgctaaa ggcaacttg	attctgtcgc tactgattac	ggtgctgcta tcgatggtt	1560
cattggtgac gtttccggcc	ttgctaatgg taatggtgct	actggtgatt ttgctggctc	1620
taattccaa atggctcaag	tcggtgacgg tgataattca	cctttaatga ataatttccg	1680
tcaatatttta cttcttgc	ctcagtcggc tgaatgtcgc	ccttatgtct ttggcgctgg	1740
taaaccatat gaattttcta	ttgattgtga caaaataaac	ttattcogtg gtgtctttgc	1800
gtttctttta tatgttgcca	cctttatgtc tgtattttcg	acgtttgctc acataactgcg	1860
taataaggag tcttaataag	cttgacactgt	gaagtggaaaa atggcgcaca	1920
ttttttttgt ctgcgttta	ccgctactgc gtcacggatc	tccacgcgccc ctgtagcgcc	1980
gcattaagcg cggcggtgt	ggtgggttacg	cgccaggtga cgcgtacact	2040
ctagcggccg ctcccttcgc	tttcttccct	tccttctcg ccacgttgcg cgggtttccc	2100
cgtcaagctc taaatcgggg	gctcccttta	gggttccgat ttagtgctt acggcacctc	2160
gaccccaaaa aacttgatta	gggtgatggt	tcacgttagt ggcacatcgcc ctgatagacg	2220
gttttcgccc ctttgacgtt	ggagtccacg	ttctttaata gtggactttt gttccaaact	2280
ggaacaacac tcaaccctat	ctcggtctat	tcttttgatt tataagggtt tttgcccatt	2340
tcggcctatt gttttttttt	tgagctgatt	taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa	2400
atattaacgc ttacaatttc	aggtggact	tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt	2460
tgttttattt tctaaatata	ttcaaatatg	tatccgctca tgagacaata accctgataa	2520
atgcttcaat aatattgaaa	aaggaagagt	atgagattt aacatttccg tgcgcctt	2580
attccctttt ttgcggcatt	ttgccttcct	gttttgctc acccagaaac gctggtaaa	2640
gtaaaagatg ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt acatcgaaact ggatctcaac	2700
agcggtaaga tccttgagag	tttcggccccc	gaagaacgtt ttccaatgtat gagactttt	2760
aaagttctgc tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg cccggcaaga gcaactcggt	2820
cggccatac actatttc	gaatgacttg	gttgagttact caccagtcaac agaaaagcat	2880
cttacggatg gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac	2940
actgcggcca acttactt	gacaacgato	ggaggaccga aggagctaac cgctttttt	3000
cacaacatgg gggatcatgt	aactcgccct	gatcggttggg aaccggagct gaatgaagcc	3060
ataccaaacg acgagcgta	caccacgatg	cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa	3120
ctattaactg gcgaactact	tactcttagt	ttccggcaac aattgtataga ctggatggag	3180
gcggataaaag ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc cggctggctg gtttattgt	3240
gataaaatctg gagccggta	gcgtggctct	cgccgtatca ttgcagcact gggggccagat	3300
ggtaagccct cccgtatctgt	agttatctac	acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa	3360
cgaaatagac agatcgctga	gataggtgcc	tcactgatta agcattggta ggaattaaatg	3420
atgtctcggt tagataaaaag	taaagtgtatt	aacagcgcat tagagctgot taatgaggc	3480
ggaatcgaaag gtttaacaac	ccgtaaactc	gcccagaagc taggtgtaga gcagccatcaca	3540
ttgttattggc atgtaaaaaa	taagcggtt	ttgctcgacg ctttagccat tgagatgtt	3600
gataggcacc atactactt	ttgccttta	gaagggaaa gtcggcaaga tttttacgt	3660
aataacgcta aaagttttag	atgtgttta	ctaagtcatc gcgatggagc aaaagtagat	3720
ttaggtagac ggcctacaga	aaaacagtat	gaaactctcg aaaatcaatt agccttttta	3780
tgccaaacaag gtttttca	ctact agagaatgc	ttatatgcac tcagcgctgt ggggcatttt	3840
acttttaggtt ggttatttgg	agatcaagag	catcaagtgc ctaaagaaga aagggaaaca	3900
cctactactg atagatgtcc	gccattattt	cgacaagcta tcgaattatt tgatcaccaa	3960
ggtcagagc cggcattttt	attcgccctt	gaattgtatca tatgcggatt agaaaaacaa	4020
cttaaatgtg aaagtgggtc	ttaaaagcag	cataaccctt ttccgtatgt gtaacttcac	4080
tagttaaaa gatcttaggt	gaagatcctt	tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa	4140
cgtgagttt ctgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga	4200
gatccctttt ttctgcgcgt	aatctgtgc	ttgcaaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg	4260
gtggtttggt tgccggatca	agactacca	actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc	4320
agagcgaga taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt agttaggcca ccacttcag	4380
aactctgttag caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatcc tggtagccgtt ggctgtgcc	4440
agtggcgata agtcgtgtct	taccgggtt	gactcaagac gatagttacc ggataaggcg	4500

cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccc aacgacacctac 4560
 accgaactga gataacctaca gggtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 4620
 aaggcgac a ggtatccgg a aacggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 4680
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccaccc ctgacttgag 4740
 cgtcgattt t ggtatgtctc gtcagggggg cgagacccat ggaaaaaacgc cagcaacgcg 4800
 gccttttac ggttctggc cttttgtgg cctttgtctc acatgaccgg acaccatcga 4860
 atggccagat gattaattcc taatttttgt tgacactcta tcattgatag agttattttta 4920
 ccactcccta tcagtgatag agaaaagtga aatgaatagt tcgacaaaaa t 4971

<210> 3
 <211> 4765
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> pCN1/GFP24 Klonierungs- und Expressionsvektor

<400> 3

ctagataaga aggaagaaaa ataatgaaca ataacgatct ctttcaggca tcacgtcggc 60
 gtttctggc acaactcgcc ggcttaaccg tcgcgggat gctggggccg tcattgttaa 120
 cgccgcgacg tgcgactgctg gcccagccgg ccatggcgcc atccgttcaa ctacgacacc 180
 attatcaaca aaatactcca attggcgatg gccctgtct tttaccagac aaccattacc 240
 tgcgacaca atctgcctt tcgaaagatc ccaacgaaaa gcgtgaccac atggtccttc 300
 ttgagttgt aactgtgtct gggatttccg gtgggtgtgg tgctaccgg caggacctga 360
 acaccatgtt ggggtgtgt ggtagtaaag gagaagaact tttcactggta gttgtccaa 420
 ttcttgttga attagatgtt gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcaatg ggagagggtg 480
 aagggtatgc aacatacggg aaacttaccc ttaaattttt ttgcactact ggaaaactac 540
 ctgttccatg gccaacactt gtcactactt tcttttatgg ttttcaatgc ttttcccg 600
 atccggatca tatgaaacgg catgactttt tcaagagtgc catgcccggaa gtttatgtac 660
 aggaacgcac tatatcttc aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgtc gaagtcaagt 720
 ttgaaggtga taccctgtt aatcgatctc agttaaaagg tattgattt aaagaagatg 780
 gaaacattct cggacacaaa ctcgagttaca actataactc acacaatgtt tacatcacgg 840
 cagacaaaca aaagaatggg atcaaaagcta acttcaaaat tcgcccacaac attgaagatt 900
 cggcctcggg gggcgacaa caaaaactca tctcagaaga gaatctgtat ttccaggcg 960
 atgcttgcgg tggcacccgac accctgtcaag ctgaaaccgg ccagctggaa gacgagaat 1020
 ccgctctgca gactgaaatc gctaaccctgc tgaaagagaa agagaaactg gaattcattc 1080
 tggctgtca cggcggttgtt gggctaggct aataacttaa gccaaggagg aaaataaaat 1140
 gaaataccta ttgcctacgg cagccgctgg attgttatta ctgcggcac agccggccat 1200
 ggcaagcattc tgccgtggcc gtatcgctc tctggaaagaa aaagttaaaa ccctgaaagc 1260
 tcagaactcc gaactgtctt ccaccgtctaa catgtcgctt gaacaggtt ctcagctgaa 1320
 gcagaaagtt atgaaccacg ggggttgtgg tggcggttcc ctacgggtct cgggtccgg 1380
 tgattttgcgat tatgaaaaaa tggcaaaacgc taataagggg gctatgacccg aaaatgccg 1440
 tgaaaacgcg ctacgtctc acgctaaagg caaacttgat tctgtcgctt ctgattacgg 1500
 tgctgtatc gatggttca ttggtgacgt ttccggcctt gctaattggta atggtgctac 1560
 tggtgatttt gctggctcta attccaaat ggctcaagtc ggtgacgggtg ataattcacc 1620
 ttaaatgaat aatttccgtc aatatttacc ttctttgcct cagtcgggtt aatgtcgccc 1680
 ttatgtctt ggcgttgta aaccatatga attttctatt gattgtgaca aaataaaactt 1740
 attccgttgtt gtctttgcgt ttcttttata tggccacc tttatgtatg tattttcgac 1800
 gtttgctaaatc atactgcgtt aataaggagtc ttaataagct tgacctgtga agtaaaaat 1860
 ggcgcacatt gtgcgacatt tttttgcct gccgtttacc gctactgcgt cacggatctc 1920
 cacgcgcctt gtagcggcgc attaagcgcg gccccgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 1980
 gctacacttg ccagcgcctt agccccgcg ccttcgtctt tttcccttc ctttctcgcc 2040
 acgttcgcgg gctttccccg tcaagctcta aatccccggc tcccttttagg gttccgattt 2100
 agtgcatttc ggcacctcga ccccaaaaaa cttgatttagg gtgatgggtc acgtatgtgg 2160
 ccatgcgcctt gatagacggt tttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt cttaatagt 2220
 ggactcttgtt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttatttc ttttgcattt 2280
 taagggattt tgccgatttc ggcttattgg taaaaaaatg agctgattta aaaaaattt 2340
 aacgcgcattt caacgcattac aatttcagggt ggcacttttcc gggggaaatgt gcgcggacc 2400
 cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 2460
 tgataaaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatgg agaaaaaaat cactggat 2520
 accaccgtt atatatccca atggcatctt aaagaacatt ttgaggcatt tcagtcaatg 2580

gctcaatgt a cctataacca gaccgttcag ctggatatta cggcctttt aaagaccgta 2640
 aagaaaaata agcacaagtt ttatccggcc tttattcaca ttcttgcccg cctgatgaat 2700
 gctcatccgg aattccgtat ggcaatgaaa gacgtgagc tggtgatatg ggatagtgtt 2760
 caccccttgtt acaccgttt ccatgagcaa actgaaacgt tttcatcgct ctggagtgaa 2820
 taccacgacg atttccggca gtttctcacac atatattcgc aagatgtggc gtgttacggt 2880
 gaaaacctgg cctatttccc taaaagggtt attgagaata ttttttcgt ctcaagccaat 2940
 ccctgggtga gtttcaccag ttttgattta aacgtggca atatggacaa cttcttcgccc 3000
 cccgtttca ctatggcaaa atattatacg caaggcgaca aggtgctgtat ggcgctggcg 3060
 attcagggtt atcatgccgt ttgtgatggc ttccatgtcg gcagaatgtct taatgaatta 3120
 caacagtact gcgtatgagtg gcaaggcgccc gctaatagg aattaatgtat gtctcgitta 3180
 gataaaaatgta aagtgattaa cagcgcattt gagctgctta atgaggtcgg aatcgaaggt 3240
 ttaacaaccc gtaaactcgc ccagaagcta ggtgttaggc agcctacatt gtattggcat 3300
 gtaaaaaata agcgggctt gctcgacgcc tttagccattt agatgttaga tagcaccat 3360
 actactttt gccctttttaga aggggaaagg tggcaagatt ttttacgtaa taacgctaaa 3420
 agttagttagt gtgtttact aagtcatcgc gatggagcaa aagtacattt aggtacacgg 3480
 cctacagaaa aacagtatga aactctcgaa aatcaatttgc cttttttatg ccaacaagg 3540
 ttttcaactt agaatgcatt atatgcactc agcgcagtgg ggcattttac ttttaggttgc 3600
 gtatttggaaatc acaagagca tcaagtcgtt aaagaagaaa gggaaacacc tactactgt 3660
 agtatgccgc cattattacg acaagctatc gaattatttgc atcaccacagg tgcagagcca 3720
 gccttcttat tcggccttga attgatcata tgcggatttag aaaaacaact taaatgtgaa 3780
 agtgggtctt aaaagcagca taaccttttccgtatgtt aacttcacta ttaacgctcg 3840
 gttggcccgcc ggcgtttttt aatattttgt taacttagttt aaaaaggatct aggtgaagat 3900
 cctttttgtat aatctcatga cccaaatccc ttaacgttag ttttcgttcc actgagcgtc 3960
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttcc tttagatctt tttttctgc gctaatctg 4020
 ctgottgcaa aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggtggg tttttgcggg atcaagagct 4080
 accaacttcc ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 4140
 tctagtgttag ccgtatgttgc gcccacactt caagaactctt gtagcaccgc ctacataacct 4200
 cgctctgcta atccctgttac cagtggctgc tgccagtgcc gataagtctt gtcttaccgg 4260
 gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgcc tcgggctgaa cgggggggttc 4320
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4380
 gctatgagaa agcgccacgc ttccccaaagg gagaaggcg gacaggatctt cggttaagcg 4440
 cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gttccaggg gaaacgcctt ggtatcttta 4500
 tagtccctgtc gggttcgtcc acctctgact tgagcgtcgat tttttgtat gctcgtcagg 4560
 gggccggagc ctatggaaaa acggcagcaaa cgcggcctt ttacggttcc tggccttttg 4620
 ctggcctttt gctcacatga cccgacacca tcgaatggcc agatgattaa ttcctaattt 4680
 ttgttgacac tctatcattt atagagttat tttaccactc cctatcgtt atagagaaaa 4740
 gtgaaatgaa tagttcgaca aaaaatgtt 4765

<210> 4
 <211> 823
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> reife TEM-1 β -Lactamase Klonierungskassette
 <400> 4

ggcccagccg gccatggctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaaagatg ctgaagatca 60
 gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 120
 ttttcgtcccc gaagaacgtt ttccaaatgtt gggactttt aaagttctgc tatgtggcgc 280
 ggtattatcc cgtatttgacg ccgggcaaga gcaactcggt cggccgcatac actattctca 240
 gaatgactt gttgagttact caccagtca c agaaaagcat ctacggatg gcatgacagt 300
 aagagaattt tgcagtgtcg ccataaccat gagtgataac actgcggccca acttacttct 360
 gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttgc cacaacatgg gggatcatgt 420
 aactcgcctt gatcggttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaccg acgagcgtga 480
 caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgc当地 ctatcgtt gcaactact 540
 tactcttagt tcccgccaaac aatttgataga ctggatggag gggataaaag ttgcaggacc 600
 acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgtt gataaatctg gagccgggtga 660
 gctgtgtctt cgcgttatca ttgcagcact gggccagat ggttaagccctt cccgtatcgt 720
 agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa cggaaatagac agatcgtga 780

gataggtgcc tcactgatta agcattggtc ggccctcgaaaa gcc

823

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.